

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

TNF-Rezeptor 1- und 2-spezifische Entzündungsreaktionen im Glomerulus



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anela Taubitz
aus Gradacac
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: PD Dr. Deryon Tilki

Prof. Dr. Helmut Schiffl

PD Dr. Dorit Nögler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2012

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und noch keiner Hochschule zu Prüfungszwecken vorgelegt wurde. Ich habe noch nicht versucht eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, 18. 01. 2012

Anela Taubitz

Für Ana

per aspera ad astra

Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Abstract-Form veröffentlicht:

1. Vielhauer V, Taubitz A, Bertler S, Eltrich N, Radomska E, Schlöndorff D. Expression of TNF receptors in intrinsic glomerular cells. Nieren Hochdruckkr., 35: 430, 2006.
(37. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Essen 23.09.-26.09.2006, Poster Mo-P7-08)
2. Vielhauer V, Taubitz A, Eltrich N, Bertler S, Radomska E, Schlöndorff D. Differential expression of TNF-receptors in intrinsic glomerular cells. J. Am. Soc. Nephrol., 17: 744A, 2006.
(39th Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Diego 14.11.-19.11.2006, Poster SA-PO803)
3. Taubitz A, Eltrich N, Bertler S, Radomska E, Vielhauer V. Expression of TNF-receptor 1 and 2 in glomerular endothelial and mesangial cells. Nephrol. Dial. Transplant., 22 (Suppl 6): vi104, 2007.
(XLIV Congress, European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association, Barcelona 21.06.-24.06.2007, Poster FP259)
4. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Preferential glomerular, not tubular expression of TNF receptor 1 and 2 in mouse kidney. Nieren Hochdruckkr., 36: 390, 2007.
(38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München 22.09.-25.09.2007, Poster So-2-P23)
5. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. TNF-receptor 1 and 2 are preferentially expressed in the glomerular, but not tubulointerstitial compartment of mouse kidney. J. Am. Soc. Nephrol., 18: 194A, 2007.
(40th Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Francisco 31.10.-05.11.2007, Poster F-PO421)

6. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. TNF receptor 1- and 2-specific inflammatory responses in the glomerulus. Nieren Hochdruckkr., 37: 485, 2008.
(39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen 27.09.-30.09.2008, Poster P 132)
7. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. TNF receptor-specific inflammatory responses in the glomerulus. J. Am. Soc. Nephrol., 19: 420A, 2008.
(41st Annual Meeting, American Society of Nephrology, Philadelphia 04.11.-09.11.2008, Poster F-PO1395)
8. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Die TNF-Rezeptoren 1 und 2 vermitteln unterschiedliche glomeruläre Entzündungsreaktionen. Abstract CD-ROM.
(115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 18.04.-22.04.2009, Poster PS 114)
9. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Distinct roles of TNF receptor 1 and 2 in glomerular inflammation. Nephrol. Dial. Transplant. Plus, 2 (Suppl. 2), 2009.
(ISN World Congress of Nephrology, Mailand 22.05.-26.05.2009, Poster M393)
10. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Glomerular TNF receptor 1 and 2 mediate distinct inflammatory responses following TNF stimulation. Nieren Hochdruckkr., 38: 482-483, 2009.
(1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen 26.09.-29.09.2009, Poster P 217)
11. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. Glomerular TNF receptor 1 and 2 mediate distinct inflammatory responses upon TNF exposure. J. Am. Soc. Nephrol., 20: 303A, 2009.
(42nd Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Diego 27.10.-01.11.2009, Poster TH-PO835)

12. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Vielhauer V. Characterization of the TNF-induced glomerular inflammosome. Nephrol. Dial. Transplant. Plus, 3 (Suppl. 3): iii130, 2010. (XLVII Congress, European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association / 2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, München 25.06.-28.06.2010, Poster Sa292).

Die im Rahmen der Promotionsarbeit etablierte Methodik der kompartimentspezifischen renalen Gewebeisolation wurde zusätzlich in weiteren Projekten der Arbeitsgruppe angewendet:

Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Anders HJ. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. J. Am. Soc. Nephrol., 20: 1986-1996, 2009.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	13
2 Einleitung.....	19
2.1 Das Nephron, die funktionelle Untereinheit der Niere	19
2.2 Die Glomeruli, die Mikrofilter der Niere	20
2.3 Die Glomerulonephritis, eine entzündliche Veränderung der Glomeruli.....	23
2.3.1 Die Immunkomplex-Glomerulonephritis.....	25
2.3.2 Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses (SLE)	26
2.3.3 Die Lupusnephritis, prognosebestimmender Faktor der SLE	28
2.3.4 Charakterisierung des MRL/lpr Mausmodells der Lupusnephritis	30
2.4 Das TNF/TNF-Rezeptorsystem als Ziel einer anti-inflammatorischen Therapie renaler Erkrankungen	32
2.4.1 TNF als Mediator entzündlicher Erkrankungen.....	32
2.4.2 Vermittlung biologischer TNF-Effekte durch Tnfr1 und Tnfr2	35
2.4.2.1 Signaltransduktion durch Tnfr1	36
2.4.2.2 Signaltransduktion durch Tnfr2	38
2.4.3 Proinflammatorische und immunsuppressive Funktionen von TNF	40
2.4.4 TNF bei entzündlichen Nierenerkrankungen	42
2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	43
2.5.1 Analyse der Tnfr-Expression und Tnfr-abhängig exprimierter Entzündungsmediatoren in vivo	44
2.5.2 Identifizierung Tnfr-abhängig exprimierter Entzündungsmediatoren in Glomeruli ex vivo	44
2.5.3 Analyse Tnfr-abhängiger Expression von Entzündungsmediatoren in primären glomerulären Mesangialzellen	45
2.5.4 Die Rolle der TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis	45
3 Material und Methoden	46
3.1 Material	46
3.1.1 Geräte	46
3.1.2 Tierhaltung	47
3.1.3 Chemikalien.....	47
3.1.4 Plastikwaren	48
3.2 Methoden	49
3.2.1 Glomerulus-Isolation und Zellkultur	49
3.2.1.1 Paramagnetische Glomeruli-Isolation	49
3.2.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen	51
3.2.1.3 Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl.....	51
3.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	52
3.2.1.5 Kultivierung glomerulärer Endothel- und Mesangialzelllinien	52
3.2.1.6 Kultivierung, Stimulation und Ernte der Glomeruli.....	53
3.2.1.7 Gewinnung und Kultivierung von primären Mesangialzellen.....	54
3.2.1.8 Subkultivierung von Zellen	55
3.2.1.9 Charakterisierung der primären glomerulären Mesangialzellen	55
3.2.1.10 Gewinnung von Splenozyten	56
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	57
3.2.2.1 RNA-Isolation.....	57

3.2.2.2 Bestimmung der RNA-Reinheit und der RNA-Konzentration	57
3.2.2.3 cDNA-Synthese	59
3.2.2.4 Quantitative RT-PCR	60
3.2.3 Microarrays.....	62
3.2.3.1 Auswertung der Microarrays	63
3.2.3.2 Einteilung Tnfr1-abhängig regulierter Gene in funktionelle Gruppen	64
3.2.3.3 Zuordnung der Tnfr1-abhängig regulierten Gene zu KEGG-Signalwegen	66
3.2.4 Immunhistologische Untersuchungen.....	68
3.2.4.1 Immunhistologischer Nachweis von TNF-Rezeptoren in der Mausniere	68
3.2.5 Immunologische Untersuchungen	69
3.2.5.1 Durchflusszytometrie (FACS).....	69
3.2.5.1.1 Oberflächenexpression von TNF-Rezeptoren auf glomerulären Zelllinien	69
3.2.5.1.2 Bestimmungen von Oberflächenmarkern auf Nierenzellen	71
3.2.5.1.3 Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Milzzellen	73
3.2.5.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	74
3.2.5.2.1 Ccl2/Mcp-1-, Ccl5/Rantes- und Cxcl10/lp-10-Konzentrationsbestimmung.....	74
3.2.5.2.2 Bestimmung der Albuminurie	75
3.2.6 Kreatininbestimmung	75
3.2.7 Tierversuche.....	76
3.2.7.1 Versuchstierhaltung	76
3.2.7.2 Versuchstiere	76
3.2.7.3 Rückkreuzung der Tnfr-defizienten Mäuse in den MRL/lpr-Hintergrund ..	78
3.2.7.4 Genotypisierung	79
3.2.7.5 Narkotisieren der Mäuse	82
3.2.7.6 Urin-, Blut- und Gewebeentnahme.....	83
3.2.8 Statistische Auswertung	84
4 Ergebnisse.....	85
4.1 Paramagnetische Glomeruli-Isolation aus Mausnieren.....	85
4.2 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in gesunder Mausniere	87
4.3 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in intrinsischen glomerulären Zelllinien	89
4.4 Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in gesunden Mausnieren ..	91
4.5 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 nach intraperitonealer TNF-Applikation <i>in vivo</i> ...	93
4.6 Expression glomerulärer Endzündungsmediatoren nach intraperitonealer TNF-Applikation	94
4.7 Glomeruläre Leukozyten-Infiltration als Folge einer TNF-Exposition	96
4.8 cDNA-Microarray-Analyse von Glomeruli	97
4.8.1 Tnfr1-abhängig regulierte Gene.....	102
4.8.1.1 Einteilung Tnfr1-abhängig regulierter Gene in funktionelle Gruppen	111
4.8.1.2 Zuordnung der Tnfr1-abhängig regulierten Gene zu „biologischen Prozessen“	115
4.8.1.3 Zuordnung Tnfr1-abhängig regulierter Gene zu KEGG-Signalwegen ...	116
4.8.1.3.1 KEGG-Signalweg: Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion	118
4.8.1.3.2 Toll-like-Rezeptor-Signalweg.....	120
4.8.1.3.3 Transendotheliale Leukozytenmigration	121
4.8.1.3.4 Zelladhäsionsmoleküle	123

4.8.1.3.5 Komplement und Koagulationskaskade	125
4.8.1.3.6 Apoptose	126
4.8.2 Tnfr2-abhängig regulierte Gene.....	127
4.9 Verifizierung ausgewählter Tnfr-abhängig regulierter Gene.....	129
4.9.1 Tnfr1-abhängig regulierte Chemokine und Adhäsionsmoleküle	129
4.9.2 Verifizierung der Tnfr2-abhängigen Expression der Rab6b-GTPase.....	132
4.10 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Tnfr1-vermittelten glomerulären Genexpressionsmuster	133
4.11 Proteinexpression von Tnfr1-abhängig exprimierten Entzündungsmediatoren in Glomeruli	138
4.12 Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen	140
4.12.1 Charakterisierung der primären Mesangialzellen	140
4.12.2 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in primären Mesangialzellen	141
4.12.3 Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen	142
4.13 Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis	145
4.13.1 Bestimmung der Überlebensrate	146
4.13.2 Gewicht	147
4.13.3 Serumchemie	147
4.13.4 Albuminurie.....	148
4.13.5 Veränderungen in der Milz von Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen.....	149
4.13.6 Nachweis renaler Leukozyteninfiltration	152
5 Diskussion	154
5.1 Bedeutung von TNF/TNF-Rezeptoren bei der Glomerulonephritis	154
5.2 Tnfr-Expression in gesunden Glomeruli und glomerulären Zelllinien	156
5.3 TNF induziert die glomeruläre Expression von Entzündungsmediatoren in vivo	158
5.4 Glomeruläre Leukozyten-Infiltration nach systemischer TNF-Stimulation.....	160
5.5 Tnf-Rezeptor-spezifische inflammatorische Antwort in TNF-stimulierten Glomeruli ex vivo.....	161
5.5.1 Tnfr1-abhängig regulierte Gene in TNF-stimulierten Glomeruli	163
5.5.2 Tnfr2-abhängig regulierte Gene in TNF-stimulierten Glomeruli	165
5.6 Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen	167
5.7 Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis	168
5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick	171
6 Anhang	174
7 Literaturverzeichnis	207
8 Abkürzungsverzeichnis.....	222
9 Lebenslauf.....	225
10 Danksagung	231

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die funktionelle Untereinheit der Niere: Das Nephron [2].	19
Abbildung 2: Rasterelektronische Aufnahmen (A, B) und schematischer Aufbau eines Glomerulus (C):	21
Abbildung 3: Darstellung der Blut-Harn-Schranke in einem Glomerulum (A, B).	22
Abbildung 4: Schematische Übersicht der Pathogenese der SLE [18].	28
Abbildung 5: Mausmodell der SLE.	30
Abbildung 6: Erkrankungsverlauf bei MRL/lpr-Mäusen.	31
Abbildung 7: Leukozytär-endotheliale Interaktionen während der Leukozyteninfiltration:	34
Abbildung 8: Signaltransduktion durch Tnfr1 und Tnfr2 [33].	39
Abbildung 9: Paramagnetische Glomeruli-Isolation (A-F) [106].	51
Abbildung 10: Gestaltung der KEGG-Signalwegdiagramme [116].	67
Abbildung 11: Rückkreuzung der Tnfr-defizienten C57BL/6J-Mäuse.	79
Abbildung 12: Gewonnene Nierenfraktionen aus einer C57BL/6J-Maus mit Hilfe der paramagnetischen Glomeruli-Isolation:	85
Abbildung 13: Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten Nierenfraktionen.	86
Abbildung 14: Kompartimentspezifische Tnfr1- und Tnfr2-Expression in Mausnieren.	87
Abbildung 15: Tnfr1- und Tnfr2-Expression in intrinsischen glomerulären Zelllinien.	90
Abbildung 16: Kompartimentspezifische mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren in gesunden Mausnieren.	92
Abbildung 17: Tnfr1- und Tnfr2-mRNA-Expression nach einer TNF-Behandlung.	94
Abbildung 18: Glomeruläre Expression von Entzündungsmediatoren nach einer TNF-Exposition.	95
Abbildung 19: Nachweis der glomerulären Leukozyteninfiltration nach einer TNF-Behandlung.	96
Abbildung 20: Ccl2-mRNA-Expression in Glomeruli in vitro nach einer TNF-Behandlung.	98
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei dem cDNA-Microarray-Experiment.	99
Abbildung 22: Der Anteil gleichsinnig bzw. differenziell Tnfr-abhängig exprimierter Gene in TNF-stimulierten Glomeruli.	101
Abbildung 23: Visuelle Darstellung der 219 Tnfr1-abhängig regulierten Gene als „Heatmap“.	103
Abbildung 24: KEGG-Signalweg „Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion“.	119
Abbildung 25: Toll-like-Rezeptor-Signalweg mit Tnfr1-abhängig regulierten Genen.	121
Abbildung 26: Signalweg „transendotheliale Leukozytenmigration“.	122
Abbildung 27: Der Signalweg „Zelladhäsionsmoleküle“.	124
Abbildung 28: Der Signalweg „Komplement und Koagulationskaskade“.	125
Abbildung 29: Der Signalweg „Apoptose“.	126
Abbildung 30: Visuelle Darstellung der Tnfr2-abhängig regulierten Gene als „Heatmap“.	127
Abbildung 31: Verifizierung der repräsentativen Chemokine (A-B) und Adhäsionsmoleküle (C-F) aus Microarray-Versuchen.	131
Abbildung 32: Verifizierung des Transkriptionsprofils von Rab6b.	133

Abbildung 33: Vergleich der Transkriptionsprofile der Chemokine und Adhäsionsmoleküle nach einer 12- und 24-stündigen TNF-Stimulation.	136
Abbildung 34: Vergleich der Transkriptionsprofile der Chemokine und Adhäsionsmoleküle nach einer 12- und 24-stündigen TNF-Stimulation.	137
Abbildung 35: Tnfr-abhängige Regulation der Chemokine Ccl2/Mcp-1 (A), Ccl5/Rantes (B) und Cxcl10/lp-10 (C) auf Protein-Ebene in TNF-stimulierten Glomeruli.	139
Abbildung 36: Charakterisierung der primären glomerulären Mesangialzellen.....	141
Abbildung 37: Tnfr1- und Tnfr2-Expression in primären Mesangialzellen.	142
Abbildung 38: Expression von Chemokinen (A-B) und Zelladhäsionsmolekülen (C-F) in primären Mesangialzellen.....	144
Abbildung 39: Mortalität in Wildtyp-, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen.....	146
Abbildung 40: Gewichtsverlauf in Wildtyp, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen.	147
Abbildung 41: Parameter der Serumchemie in Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen in der 24. Lebenswoche.	148
Abbildung 42: Albuminurie in Wildtyp, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen.....	149
Abbildung 43: Milz- (A) und Lymphknotengewicht (B) und Splenozytenzahlen in Milz (C) von Wildtyp,	150
Abbildung 44: Leukozytenpopulationen in der Milz der MRL/lpr-Tnfr-defizienten Mäuse.	151
Abbildung 45: Renale Leukozyteninfiltration bei Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen.....	153

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Lupusnephritis gemäß der ISN/RPS.....	29
Tabelle 2: Proinflammatorische versus immunsuppressive Funktionen von TNF [33]...	41
Tabelle 3: Überblick über die zur charakterisierung primärer Mesangialzellen verwendeten Antikörper.....	56
Tabelle 4: Oligonukleide (Primers) zur mRNA-Genexpressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR.	61
Tabelle 5: PCR-Mix	80
Tabelle 6: Primer für die PCR.....	81
Tabelle 7: Anästhesie- und Antagonisten-Lösung für die Blutentnahme bei Mäusen....	82
Tabelle 8: Gene mit Tnfr1-abhängigem Expressionsmuster (Auswahl).	105
Tabelle 9: Einteilung der in Tnfr1-/- Glomeruli differenziell exprimierten Gene in funktionelle Gengruppen.	112
Tabelle 10: Zuordnung der 219 Tnfr1-regulierten Gene zu biologischen Prozessen (Auswahl).	115
Tabelle 11: Zuordnung Tnfr1-abhängig regulierter Gene zu zellulären Signalwegen. .	117
Tabelle 12: Gene mit Tnfr2-abhängigem Expressionsmuster.....	128
Tabelle 13: Rückkreuzung Tnfr-defizienter Mäuse im MRL/lpr-Hintergrund.	146

1 Zusammenfassung

Die von intrinsischen renalen Zellen und infiltrierenden Leukozyten exprimierten Zytokine sind zentrale Vermittler entzündlicher Nierenerkrankungen. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF) ist ein solches proinflammatorisches Zytokin, das in der glomerulären Entzündungsreaktion involviert ist. Die funktionelle Rolle von TNF wurde in Tiermodellen der Glomerulonephritis belegt. Die biologischen Effekte von TNF werden durch die beiden funktionell eigenständigen TNF-Rezeptoren TNFR1 (CD120a) und TNFR2 (CD120b) vermittelt. Neuere Daten zeigen, dass in Modellen einer Immunkomplex-Glomerulonephritis wie der nephrotoxische Serumnephritis die beiden TNF-Rezeptoren *in vivo* unterschiedliche Funktionen bei der glomerulären Entzündung vermitteln können.

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass Tnfr1 und Tnfr2 unterschiedliche inflammatorische TNF-Effekte in Glomeruli vermitteln. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Expression und Funktion der beiden TNF-Rezeptoren in Maus-Glomeruli zu charakterisieren und die Tnfr-abhängig exprimierten Entzündungsmediatoren in Maus-Glomeruli zu identifizieren. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnten selektive, Tnfr-spezifische Therapien zur Hemmung der glomerulären Entzündungsreaktion entwickelt werden. Zudem wurde in dieser Arbeit die funktionelle Rolle der beiden TNF-Rezeptoren im MRL/lpr-Mausmodell der Lupusnephritis untersucht, um eine selektive Tnfr-Blockade als mögliche Therapiestrategie zu charakterisieren. Hierfür war eine Rückkreuzung von Tnfr1- und Tnfr2-defizienten C57BL/6J-Mäusen in den MRL/lpr-Hintergrund erforderlich.

Um TNF-Rezeptor-1- und 2-vermittelte inflammatorische Signalwege in Glomeruli zu identifizieren wurde die Expression und die Funktion der beiden TNF-Rezeptoren in Mausnieren, in isolierten Glomeruli *ex vivo* und murinen glomerulären Endothel- und Mesangialzellen *in vitro* untersucht. In normaler Mausniere konnte eine Tnfr1- und Tnfr2-mRNA- und Protein-Expressionen präferentiell in Glomeruli im Vergleich zum Tubulointerstitium nachgewiesen werden.

Die Expression von beiden TNF-Rezeptoren und die TNF-induzierte Induktion von Tnfr2-mRNA-Expression wurde auch *in vitro* sowohl in murinen glomerulären Endothel- als auch Mesangialzelllinien bestätigt. Die prominente glomeruläre TNF-Rezeptor-Expression korrelierte mit einer konstitutiven glomerulären mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen wie Icam-1, Vcam-1, E- und P-Selektin und Chemokinen wie Ccl2, Ccl3 und Ccl5.

Eine intraperitoneale TNF-Injektion induzierte die Expression dieser Mediatoren präferentiell in Glomeruli. Diese *in vivo* TNF-Exposition führte zu einer raschen glomerulären Akkumulation von Leukozyten einschließlich Neutrophilen und mononukleären Phagozyten, die mittels einer kompartimentspezifischer Durchflußzytometrie analysiert wurden. Um Tnfr-abhängige inflammatorische Effekte in intrinsischen glomerulären Zellen unabhängig von infiltrierenden Leukozyten zu untersuchen, wurde eine *Microarray*-Gene-Expressionsanalyse an intakten Glomeruli durchgeführt, die aus Wildtyp und Tnfr-defizienten Mäusen isoliert und anschließend mit TNF *ex vivo* stimuliert wurden. Die meisten TNF-Effekte wurden ausschließlich durch Tnfr1 vermittelt, unter anderem die induzierte mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Chemokinen, Komplement-Faktoren und proapoptotischen Molekülen. Im Gegensatz dazu fanden wir nur vier Tnfr2-abhängig exprimierte Gene, einschließlich einer kleinen GTPase der Rab-Familie (Rab6b). Diese Ergebnisse wurden durch quantitative RT-PCR-Analysen von TNF-stimulierten Glomeruli und primären Mesangialzellen bestätigt. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings auch einen Beitrag von Tnfr2 bei der gesteigerten glomerulären Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokine nach Stimulation mit niedrigen TNF-Konzentrationen auf. Im Gegensatz zur Wildtyp-Kontrolle fehlte in TNF-stimulierten Tnfr1-defizienten Glomeruli die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Chemokine beinahe vollständig. Interessanterweise war die Proteinexpression auch in Tnfr2-defizienten Glomeruli signifikant herunterreguliert.

Folglich sind die meisten inflammatorischen TNF-Effekte in Glomeruli via Tnfr1 durch die induzierte Expression von proinflammatorischen Mediatoren wie Adhäsionsmolekülen und Chemokinen vermittelt. Darüber hinaus dürfte Tnfr2 zu dieser inflammatorischen Antwort beitragen, wenn Glomeruli niedrigen TNF-Konzentrationen ausgesetzt sind.

Ferner scheint Tnfr2 posttranskriptionell die Chemokinsekretion in Glomeruli nach einer TNF-Exposition zu beeinflussen, möglicherweise durch die Tnfr2-abhängig exprimierte Rab GTPase Rab6b, die am intrazellulären Transport und der Sekretion von inflammatorischen Molekulan beteiligt sein könnte.

In Bezug auf Tnfr-spezifische, anti-inflammatorische Therapien weisen die hier präsentierten Ergebnisse somit darauf hin, dass eine selektive Tnfr1-Blockade eine glomeruläre, insbesondere durch Granulozyten und Makrophagen vermittelte Entzündung verbessern könnte, möglicherweise bei geringer Hemmung immunregulatorischer und antimikrobieller Funktionen von TNF, die redundant durch Tnfr2 vermittelt werden könnten. Dagegen erscheint aufgrund der erhobenen Daten im MRL/lpr-Mausmodell eine Blockade von TNF oder beider Rezeptoren bei der Lupusnephritis, in der glomeruläre Neutrophileninfiltrate keine entzündliche Rolle spielen, weniger erfolgversprechend. Gleichzeitig weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine immunsuppressive, die systemische Immunreaktivität beim SLE begrenzende Funktion von Tnfr2 hin.

Abstract

Cytokines produced by intrinsic renal cells and infiltrating leukocytes are central mediators of inflammatory kidney diseases. Tumor necrosis factor- α (TNF) is such a potent proinflammatory cytokine involved in glomerular inflammation. The functional role of TNF in GN has been demonstrated in animal models. Biological activities of TNF are mediated through the two functionally distinct TNF-receptors TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b). More recent data demonstrated distinct roles of the two TNF receptors in mediating glomerular inflammation, especially in the setting of immune complex disease like the nephrotoxic serum nephritis model.

This thesis set up the hypothesis that Tnfr1 and Tnfr2 mediate different TNF effects in glomeruli. Therefore the aim of this study was to characterize the expression and function of the two TNF receptors in mouse glomeruli and to identify the TNF receptor-specific expression of inflammatory mediators in mouse glomeruli. Furthermore, for the first time phenotype analyses have been accomplished for the functional role of the two TNF receptors in the MRL/lpr mouse model of lupus nephritis within this study. For this, a backcrossing of Tnfr1- and Tnfr2-deficient C57BL/6J mice into the MRL/lpr background was necessary.

To identify TNF-receptor 1 (Tnfr1)- and 2 (Tnfr2)-mediated inflammatory pathways in glomeruli expression and function of both TNF receptors were investigated in murine kidneys, in isolated glomeruli *ex vivo*, and in murine glomerular endothelial and mesangial cells *in vitro*. In normal kidney Tnfr1 and Tnfr2 mRNA and protein were preferentially expressed in glomeruli compared to the tubulointerstitium. Expression of both Tnfrs and TNF-induced upregulation of Tnfr2 mRNA could be confirmed in murine glomerular endothelial and mesangial cell lines. Glomerular Tnfr expression correlated with a constitutive glomerular mRNA expression of adhesion molecules like Icam-1, E- and P-selectin, and chemokines like Ccl2, Ccl3 and Ccl5. Intraperitoneal injection of TNF resulted in an induced expression of these mediators preferentially in glomeruli.

In vivo, TNF exposure led to a rapid glomerular accumulation of leukocytes, including neutrophils and mononuclear phagocytes, as detected by compartment-specific flow cytometry.

To examine Tnfr-specific inflammatory responses in intrinsic glomerular cells but not infiltrating leukocytes microarray gene expression profiling was performed on intact glomeruli isolated from wild-type and Tnfr-deficient mice following TNF exposure ex vivo. Most TNF-mediated responses were exclusively mediated by Tnfr1, including induced mRNA expression of adhesion molecules, pro-inflammatory chemokines, complement factors and pro-apoptotic molecules. In contrast, we found only 4 genes with a Tnfr2-dependent expression pattern, including a small GTPase of the Rab family (Rab6b). These findings were confirmed by quantitative PCR analysis of TNF-stimulated glomeruli and primary mesangial cells. However, the latter experiments also revealed a contribution of Tnfr2 to the glomerular expression of adhesion molecules and chemokines at lower TNF concentrations. Protein expression of several proinflammatory chemokines was almost completely absent in Tnfr1-deficient glomeruli following TNF stimulation. Interestingly, protein expression was also significantly downregulated in glomeruli lacking Tnfr2. In vivo, TNF-induced glomerular leukocyte infiltration was markedly reduced in Tnfr1- and Tnfr1,2 double-deficient mice, with Tnfr2-deficiency only affecting accumulation of mononuclear phagocytes, but not neutrophils.

In summary, these studies indicate that most inflammatory TNF effects in glomeruli are mediated via Tnfr1 through induced expression of proinflammatory mediators like adhesion molecules and chemokines. In addition, Tnfr2 may contribute to this inflammatory response when glomeruli are exposed to low TNF concentrations. In addition, a posttranscriptional role of Tnfr2 in chemokine secretion contributes to the inflammatory response in glomeruli, potentially involving the Tnfr2-dependently expressed Rab GTPase Rab6b, which may mediate intracellular transport and secretion of inflammatory chemokines and cytokines.

Regarding TNF receptor-specific anti-inflammatory therapies, the results presented in this study show that a selective Tnfr1 blockade may improve glomerular, especially neutrophil-mediated inflammation, potentially without inhibition of immunoregulatory and host defense functions of TNF, which could be mediated redundantly by Tnfr2. In contrast, the data obtained in the MRL/lpr mouse model demonstrate that blockade of TNF or of both TNF receptors in lupus nephritis without prominent glomerular neutrophil infiltrates is not beneficial. In fact, an immunosuppressive function of Tnfr2 has to be assumed, limiting systemic immune reactivity in SLE.

2 Einleitung

2.1 Das Nephron, die funktionelle Untereinheit der Niere

Obgleich die Nieren weniger als ein Prozent des menschlichen Körpergewichts ausmachen, werden sie mit etwa einem Fünftel des Herzmindestvolumens durchblutet [1]. Die prinzipielle Funktionsweise der Niere besteht aus zwei Schritten. Im ersten werden in einer Filterung viele Substanzen aus dem Blut zum so genannten Primärharn (Ultrafiltrat) abgeschieden, im zweiten wird der größte, für den Körper wertvolle Teil dieser Flüssigkeit kontrolliert in den Blutkreislauf zurück resorbiert.

Jeder der beiden Nieren besteht im Wesentlichen aus 1,2 Millionen mikroskopisch kleinen Bauelementen, von denen jedes einzelne Harn produzieren kann und als Nephron bezeichnet wird [1]. Das Nephron (Abbildung 1) bildet die Funktionseinheit der Niere und besteht aus einem als Glomerulus (Nierenkörperchen) bezeichneten Blutkapillarenknäuel und dem nachgeschalteten Tubulusapparat. Der Tubulus beginnt an einer napfförmigen Anschwellung, die Bowman-Kapsel, welche den Glomerulus ummantelt. Pro Tag werden von den Nieren etwa 180 Liter Primärharn im Prozess der sogenannten Ultrafiltration gewonnen und in die Tubuli transportiert, in denen weitere Stoffwechselvorgänge stattfinden. Der Primärharn wird vom Tubulussystem zu 99% rückresorbiert. Die tatsächliche Urinausscheidung beträgt dabei nur 1,5 Liter pro Tag [1].

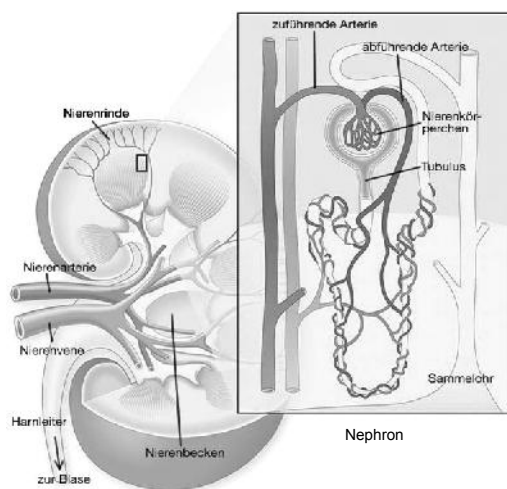


Abbildung 1: Die funktionelle Untereinheit der Niere: Das Nephron [2].

2.2 Die Glomeruli, die Mikrofilter der Niere

Die Glomeruli sind die markanteste histologische Struktureinheit der Niere. In ihnen findet die Ultrafiltration des Blutes zum Primärharn statt. Sie befinden sich in der Rindenzone der Niere und weisen einen Durchmesser von etwa 0,2 - 0,3 Millimeter auf (Abbildung 2, A, 2, B). Jede Niere enthält etwa 1,4 – 1,5 Millionen Glomeruli [1]. Man unterscheidet an ihnen einen Gefäß- und einen Harnpol. Am Gefäßpol entspringt ein Kapillarknäuel mit 30-40 Schlingen und tritt das zuführende arterielle Gefäß Vas afferens (Abbildung 2, C①) in das Glomerulus ein. Dort verzweigt es sich in das girlandenförmige Knäuel aus Kapillarschlingen (⑥). In die Wand der Vas afferens sind die sogenannten Juxtaglomeruläre Zellen (③) integriert. Gemeinsam mit den Macula densa-Zellen (⑩) des distalen Tubulus bilden sie den juxtaglomeruläre Apparat, der den Glomeruli unmittelbar anliegt. Der juxtaglomeruläre Apparat spielt im Rahmen des tubulo-glomerulären Feedbacks eine wichtige Rolle bei der Steuerung den glomerulären Durchblutung und Filtration.

Die Kapillaren des Glomerulus werden von einem interstitiellen Gewebe gestützt, das man als Mesangium bezeichnet. Es besteht aus den Mesangiumzellen (⑫) und einer extrazellulären Matrix. Bei den Mesangiumzellen handelt es sich um spezialisierte, kontraktile Mesenchymzellen, die eine Vielzahl von Hilfs- und Kontrollfunktionen ausüben. Dazu zählen: Phagozytose absterbender Zellbestandteile und Ablagerungen, Synthese einer extrazellulären Matrix, Bildung von Prostaglandinen, Endothelinen und Zytokinen sowie Kontrolle des glomerulären Blutflusses. Die den Glomerulus umgebende Bowmann-Kapsel besteht aus zwei Blättern, dem viszerale (inneren) Blatt und dem parietalen (äusseren) Blatt (⑤). Das viszerale Blatt der Bowmann-Kapsel wird von den Podozyten (⑧) gebildet. Das Epithel des parietalen Blattes der Bowmanschen Kapsel ist ein einschichtiges Plattenepithel. Zwischen beiden Blättern befindet sich der sogenannte Kapselraum (⑬), in den der Primärharn filtriert wird. Dieser Kapselraum geht am Harnpol in den Nierentubulus über. Das Kapillarendothel (⑦) der Glomeruli ist gefenstert. Die Kapillarschlingen vereinigen sich wieder zu einem ableitenden Gefäß, den Vas efferens (⑪), das ebenfalls am Gefäßpol austritt [3] [5] [6].

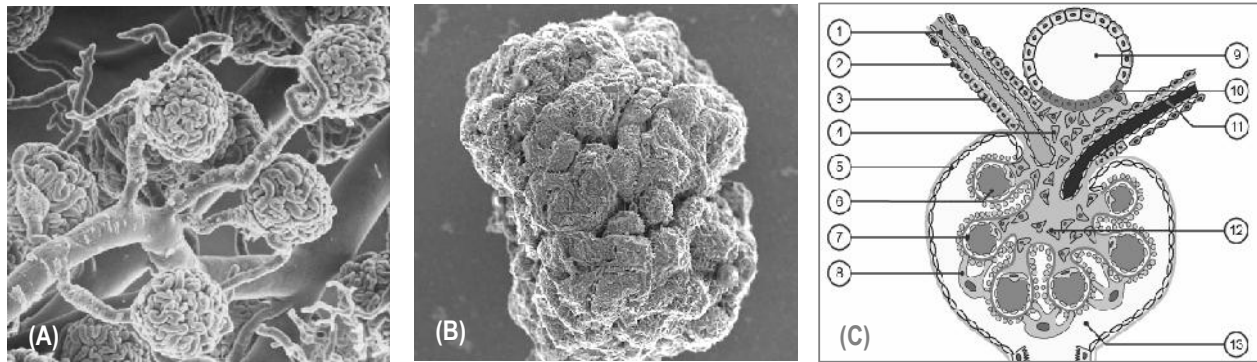


Abbildung 2: Rasterelektronische Aufnahmen (A, B) und schematischer Aufbau eines Glomerulus (C):

(1) Vas afferens, (2) Muskelschicht der Arteriole, (3) Juxtaglomeruläre Zellen, (4) extraglomeruläre Mesangiumzellen, (5) parietales Blatt der Bowmanschen Kapsel, (6) glomeruläre Kapillarschlinge, (7) Endothel der Kapillaren, (8) Podozyten, (9) Pars recta des distalen Tubulus, (10) Macula densa, (11) Vas efferens, (12) glomeruläre Mesangiumzellen (13) Kapselraum am Harnpol. Modifiziert nach Prof. B. Schwaller 2005, Universität Freiburg [3] [4] [5] [6].

Die für die Funktion des Glomerulus entscheidende Struktur ist die Blut-Harn-Schranke. Sie wird vom den Podozyten, der Basalmembran und dem Kapillarendothel gebildet (Abbildung 3). Die Blut-Harn-Schranke ermöglicht eine Selektion der filtrierten molekularen Bestandteile. Aufgrund der Filterdichte (Porengöße) und ihrer anionischen Ladung ist sie impermeabel für Blutzellen, Makromoleküle und anionische Moleküle (zum Beispiel Albumine) [3].

Die Podozyten haben primäre und sekundäre Zellfortsätze, die man auch als Füße erster und zweiter Ordnung bezeichnet. Die primären und sekundären Zellfortsätze verschiedener Podozyten verzahnen sich untereinander und bilden so ein dichtes Netz von feinen Filtrationsschlitzten ("*filtration slits*"). Sie sind von einem dünnen, nur 4 nm starken Diaphragma überzogen. Dieser Filter hält kleinere Proteine zurück.

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) ist die Hauptbarriere des glomerulären Filters und wird von den Endothelzellen und den Podozyten gebildet. Sie verbindet mittels Adhäsionsproteinen das Glomerulusendothel mit dem darunterliegenden viszeralen Blatt der Bowman Kapsel. Durch ihr dicht gewebtes Maschenwerk an Matrixmolekülen stellt sie eine mechanische Filterbarriere dar [3] [6].

Proteoglykane, insbesondere Heparansulfat verleihen ihr zudem eine fixe negative Ladung.

Das Endothel der Glomeruluskapillaren bildet die erste Schicht der Blut-Harn-Schranke. Es verfügt über zwei selektivitätsfilternde Mechanismen: Die Endothelzellen tragen einen apikalen Besatz negativ geladener Proteoglykane und Glykosaminglykane (Glykokalyx). Die Interzellularräume der Epithelzellen entsprechen Poren mit einem Durchmesser von 50-100 nm. Dadurch können kleinere Moleküle ungestört durch das Endothel treten, während Blutzellen und Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 68 kDa aufgehalten werden. Sie verbleiben während der Filtration im Gefäßlumen [3] [4] [5] [6].

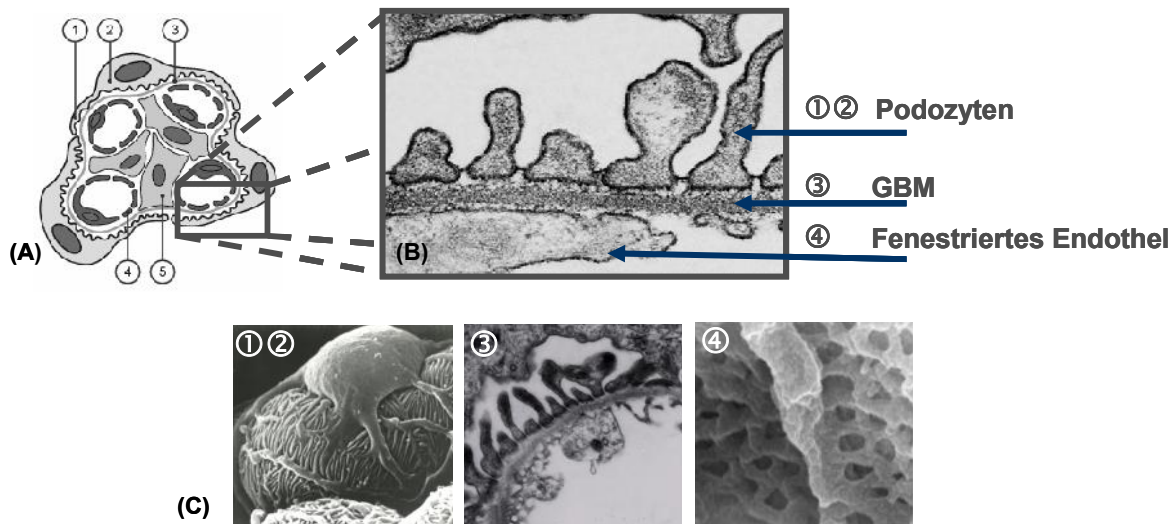


Abbildung 3: Darstellung der Blut-Harn-Schranke in einem Glomerulum (A, B).

Die Blut-Harn-Schranke (A-B) wird von den Podozyten (1)(2), dem Kapillarendothel (4) und einer dazwischengelegenen, gemeinsamen Basalmembran (GBM) (3) gebildet. Die Schranke entscheidet darüber, welche Moleküle filtriert werden und enthält hochspezialisierte Strukturen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (C) von Podozyten (1)(2), Basalmembran (3) und Innenansicht des gefenesterten Endothels (4) (*Fenestrae*) im Glomerulus der Mausniere. Modifiziert nach Prof. B. Schwaller 2005, Universität Freiburg [3] [4] [5] [6].

In ihrer Gesamtheit pressen die Glomeruli täglich 120-180 Liter Ultrafiltrat aus dem Plasma in die Bowmansche Kapsel ab. Das filtrierte Volumen aller Glomeruli pro Zeiteinheit bezeichnet man als glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Sie beträgt unter physiologischen Bedingungen rund 120 ml/Minute. Die glomeruläre Filtrationsrate ist von einer ausreichend hohen Durchblutungsrate der Glomeruli, dem Filtrationsdruck, der Filtrationsfläche und der Zusammensetzung der Filtrationsbarriere abhängig. Nach der Filtration befindet sich der Primärharn im Kapselraum und gelangt von dort in den proximalen Tubulus.

2.3 Die Glomerulonephritis, eine entzündliche Veränderung der Glomeruli

Verschiedene Kriterien charakterisieren eine Schädigung der Glomeruli: Zellproliferation, Vermehrung der extrazellulären Matrix, Sklerose, Halbmondbildung sowie eine Veränderung der Epithelzellen in ihrer Morphologie [7]. Die strukturelle Schädigung des Glomerulus durch entzündliche Prozesse (Glomerulonephritis) äußert sich in einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung und Barrierefunktion. Diese wird an der verminderten endogenen Kreatininausscheidung mit Anstieg des Serumkreatininspiegels erkennbar. Sie geht mit einer Erhöhung des Harnstoffs, des anorganischen Phosphats und der Harnsäure im Serum einher. In Folge entzündlicher Prozesse der Glomeruluskapillaren kann es zu einer Insuffizienz der Blut-Harn-Schranke mit dem Verlust der negativen Ladungseigenschaften und einer Porenvergrößerung kommen. Makromoleküle können unabhängig von ihrem Molekülradius und ihrer Ladung die Membran passieren. Es kommt zur Hämaturie und Albuminurie mit typischen Symptomkomplexen (nephritisches Syndrom und nephrotisches Syndrom).

Ein fortschreitender Funktionsverlust der Nieren führt letztendlich zum terminalen Nierenversagen mit der Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens in Form der Dialysebehandlung oder einer Nierentransplantation.

Laut QuasSi-Niere Jahresbericht 2006/2007 wurden in Deutschland seit Beginn der individuellen Erfassung der Patientendaten von 1996 bis zum 31.12.2007 mehr als 113.000 Patienten mit Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation) registriert. Davon wurden 65.000 Patienten mit Dialyseverfahren versorgt. In der Nachsorge nach Nierentransplantation befanden sich 25.000 Patienten. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz (Dialysepatienten und Patienten in Nachsorge nach Nierentransplantation) von 1.114 pro einer Million Einwohner. Im Jahr 2006 wurden 18.000 Patienten erstmalig in das Verfahren der chronischen Nierenersatztherapie aufgenommen. Dies entspricht einer Neuerkrankungsrate von 213 pro eine Million Einwohner [7]. Die Analysen über den Zeitraum von 1997 bis 2006 ergaben im Durchschnitt einen jährlichen Zuwachs der Prävalenz der Patienten in chronischer Nierenersatztherapie von 4,4% und ein Anstieg der Inzidenz von 5,1%. Als Ursache für das terminale Nierenversagen wurden bei den prävalenten Patienten eine Glomerulonephritis (23%) und der Diabetes mellitus Typ I und II (23%) am häufigsten diagnostiziert. Die jährlichen Therapiekosten für einen Dialysepatienten belaufen sich in Deutschland auf etwa 35.000 Euro, für die Betreuung eines nierentransplantierten Patienten auf etwa 15.000 Euro [7].

Ein verbessertes Verständnis der Pathogenese der Glomerulonephritiden ist erforderlich, um geeignete Therapiestrategien zu entwickeln, die die Progression zum terminalen Nierenversagen verhindern können. Insbesondere entzündliche Mechanismen der glomerulären Schädigung könnten durch gezielte immunmodulatorische Therapien beeinflusst werden. Dies gilt sowohl für die primären Formen der Glomerulonephritis als auch für die sekundären Formen, die im Rahmen von entzündlichen Systemerkrankungen auftreten.

2.3.1 Die Immunkomplex-Glomerulonephritis

Viele immunvermittelte glomeruläre Erkrankungen sind durch Bindung und Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Immunkomplexen) im Glomerulus charakterisiert und werden als Immunkomplex-Glomerulonephritiden (IK-GN) zusammengefasst [8]. Die Immunkomplexe, die die Entstehung eines glomerulären Schadens verursachen, können *in situ* gebildet werden, indem Antikörper an glomeruläre, gewebeständige Antigene binden, oder in der Blutzirkulation entstehen und sich mesangial oder im Bereich der glomerulären Kapillarschlingen ablagern [9] [10]. Die Bindung von (Auto-)Antikörpern an glomeruläre Bestandteile (Endothel-, Mesangial-, Epithelzellen oder glomeruläre Basalmembran) oder die glomeruläre Ablagerung zirkulierenden Immunkomplexe scheint bei vielen Nephritiden ein initiales Ereignis zu sein, das entzündliche Prozesse wie die Komplementaktivierung und die Einwanderung von Leukozyten in Gang setzt. Das Endothel, die Mesangialzellen und die Podozyten proliferieren reaktiv, die Basalmembran verdickt.

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung finden sich klumpenförmige Ablagerungen der Immunkomplexe im Mesangium, subepithelial (zwischen Basalmembran und Podozyten) oder subendothelial (zwischen Endothel und Basalmembran). Dabei lagern sich kleine Immunkomplexe subepithelial der GBM an und können eine membranöse Nephropathie verursachen, während größere Immunkomplexe in der Regel entlang der Kapillaren akkumulieren und eine proliferative Glomerulonephritis auslösen [11]. Es wird angenommen, dass eine Interaktion von glomerulären Mesangialzellen mit Immunkomplexen zu einer Entzündung führt, die eine Aktivierung des Komplementsystems und weiterer Entzündungsprozesse zur Folge hat. Als Ergebnis dieser initialen Aktivierung synthetisieren Mesangialzellen Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine und tragen dadurch zu einer Verstärkung der glomerulären Entzündung bei [12]. Das auslösende Antigen der IK-GN ist in vielen Fällen bekannt (Streptokokken-Infektion, Lupus erythematodes), es gibt jedoch auch Immunkomplexe mit gleichartiger Wirkung, bei denen der Auslöser und somit die Ätiologie unbekannt ist. Zu den häufigsten Formen der IK-GN zählen IgA-Nephropathie, akute postinfektiöse Glomerulonephritis und die sekundäre bei systemischen Lupus erythematodes (SLE) entstehende Lupusnephritis (LN).

2.3.2 Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses (SLE)

Beim SLE handelt es sich um eine komplexe systemische Autoimmunerkrankung, die mit exzessiver Aktivierung von T- und B-Zellen einhergeht (Abbildung 4) und sich durch eine chronische Produktion von Autoantikörpern, Immunkomplexablagerungen, Leukozyteninfiltration und Komplementaktivierung auszeichnet. Entscheidend für die Diagnose des SLE sind neben der typischen Klinik der serologische Nachweis von Autoantikörpern gegen nukleäre Autoantigene wie Doppelstrang-DNA, nukleäre Ribonukleoproteine (Smith, Ro, La, RNP) und Anti-Phospholipid-Antikörper [13]. Die Prävalenz des systemischen Lupus erythematoses ist in den verschiedenen Ländern stark unterschiedlich und schwankt zwischen 100 und 500 Erkrankten pro eine Million Menschen. In Deutschland wird die Zahl auf 45.000 Patienten geschätzt. Die Neuerkrankungsrate liegt bei 6-8 Patienten pro 100.000 Einwohner pro Jahr [14].

Die SLE zeigt eine eindeutige geschlechtsspezifische Häufung, denn 90% der Betroffenen sind Frauen. Ein Krankheitsgipfel findet sich im Alter zwischen 15 und 40 Jahren [14]. Der SLE beim Menschen und bei Mäusen ist ätiologisch zum Teil mit Polymorphismen in Genen assoziiert, die sich aufgrund ihrer physiologischen Funktionen in drei Gruppen einteilen lassen [15]. Die erste Gruppe umfasst Gene, deren Produkte bei körpereigenen Mechanismen zur Beseitigung abgestorbener Zellen aktiv sind und bei ihrer Dysregulation zur Freisetzung nukleären Autoantigene führen. Eines der Gene kodiert das Komplementprotein Cq1, das zusammen mit anderen Komplementproteinen an der wirksamen Beseitigung von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen mitwirkt [15]. Ein zweites Gen dieser Gruppe codiert die Serumkomponente Amyloid P, die Chromatin bindet und es möglicherweise vor dem Immunsystem maskiert. Veränderungen dieses Gens führen zur Entwicklung von Antikörpern gegen Chromatin und zur Entstehung einer Glomerulonephritis, da sich zirkulierende Immunkomplexe in den Nieren ablagern [15]. Auch Veränderungen des Gens für die DNase I, die das extrazelluläre Chromatin abbaut, führen zur Entwicklung von Anti-Chromatin-Antikörpern und zu einer Glomerulonephritis [15].

Die zweite Gruppe von Genen für SLE-Anfälligkeit kodiert Proteine, die an der Regulation der Toleranzschwellen bei der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten beteiligt sind: Fas, den Fas-Liganden, das Signalmolekül SHP-1, den inhibitorischen B-Zell-Rezeptor CD22 und den Zellzyklusinhibitor p21 [15].

Die Gene der dritten Gruppe kodieren Proteine, welche die Ausprägung von SLE in den einzelnen Organen beeinflussen können, da sie bei Entzündungsreaktionen beteiligt sind, die aufgrund von Immunkomplexen entstehen. Beispiele dafür sind die Polymorphismen der Gene für die Immunglobulinrezeptoren FcγRIIa und FcγRIII, bei denen die Proteinvarianten sich wahrscheinlich in ihrer Fähigkeit unterscheiden, Immunkomplexe zu binden und deren phagozytären Abbau zu ermöglichen [15].

Die Ergebnisse aus Zwillingsstudien beim SLE [16] weisen stark auf eine genetische Komponente bei der Lupus-Pathogenese hin, zeigen aber gleichzeitig die Bedeutung nicht-genetischer Faktoren wie zum Beispiel Umweltfaktoren (Exposition gegenüber UV-Licht, Abbildung 4).

Die Therapie der SLE richtet sich nach der Krankheitsaktivität. Immunsuppressiva und Glukokortikoide stehen im Mittelpunkt der Therapie. Zur Immunsuppression werden folgende Medikamente angewendet: Mycophenolat-Mofetil, Azathioprin und Cyclophosphamid [17]. Bei Patienten mit schwereren Lupus-Symptomen wird es in der Regel zusätzlich erforderlich, Glukokortikoide einzusetzen.

Angesichts der begrenzten Wirkung und des nebenwirkungsreichen Profils der bisher zur Verfügung stehenden immunsuppressiven Behandlung ist die Entwicklung von neuen Therapieansätzen von großem Interesse, um eine langfristige Remissionsinduktion zu erreichen. Potenzielle therapeutische Ansatzpunkte immunmodulatorischen Therapien könnten zum Beispiel B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Autoantikörper, zirkulierende Immunkomplexe, Zytokine, Zytokinrezeptoren, Komplementproteine und Adhäsionsmoleküle sein.

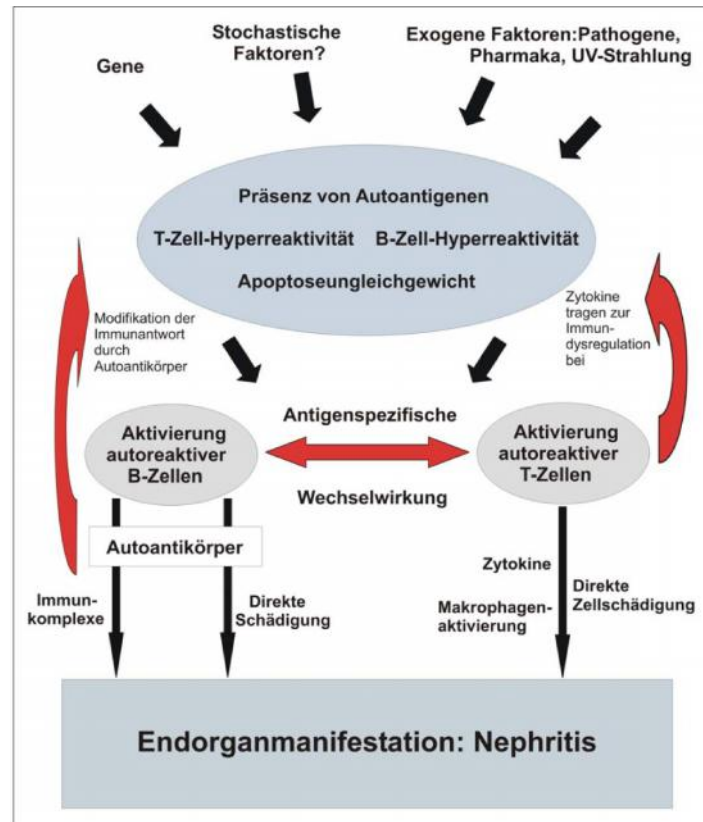


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Pathogenese der SLE [18].

2.3.3 Die Lupusnephritis, prognosebestimmender Faktor der SLE

Bei etwa 70% der SLE-Patienten kommt es zu einer Nierenbeteiligung in Form einer Lupusnephritis (chronisch progrediente Immunkomplex-Glomerulonephritis) [19]. Dabei können unterschiedliche renale Symptome auftreten: Proteinurie (100%), nephrotisches Syndrom (45-56%), Mikrohämaturie (80%), Erythrozytenzylinder (10%), Makrohämaturie (1%), eingeschränkte Nierenfunktion (40-80%), akutes Nierenversagen (30%) und Hypertonie (50%) [19]. Pathogenetisch handelt es sich bei der Lupusnephritis um eine Immunkomplex-induzierte Vaskulitis glomerulärer Kapillaren (IK-GN) mit sekundärer interstitieller Nephritis [20]. Anti-DNA-Antikörper-enthaltende Immunkomplexe scheinen ätiologisch eine wichtige Rolle zu spielen [20]. Bei Lupus-Patienten korrelieren hohe Anti-DNA-Autoantikörpertiter mit der Nephritisinzidenz [21] [22].

Tatsächlich finden sich bei der histologischen Aufarbeitung von Gewebeproben der Niere bei Lupusnephritis granuläre Antikörper (IgG)- und Komplementablagerungen, ebenso eine Akkumulation von unter anderem Anti-DNA- und Anti-Nukleosomen-Autoantikörpern [23] [24]. Morphologisch wird neben Ablagerungen von Antikörpern und Komplement in den Nieren allerdings auch eine markante Leukozyteninfiltration beobachtet. Neben dem Effekt von Autoantikörpern kommt möglicherweise diesen einwandernden Entzündungszellen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Lupusnephritis zu. Wie verschiedene immunhistochemische Untersuchungen an Biopsiematerial von SLE Patienten zeigen, handelt es sich dabei in erster Linie um T-Zellen [25] [26]. Konsistent wird dabei von einer Prädominanz von CD4⁺Zellen berichtet [25] [27], allerdings finden sich auch CD8⁺T-Zellen. Die Lupusnephritis wird nach der WHO in sechs verschiedene Klassen eingeteilt (Tabelle 1) [28].

Tabelle 1: Klassifizierung der Lupusnephritis gemäß der ISN/RPS

(*Society of Nephrology/Renal Pathology Society*, modifiziert nach Weening et al., 2004, [28]).

Klasse	Glomeruläre Läsionen	
Klasse I	minimale mesangiale Lupusnephritis	normale Glomeruli in der Lichtmikroskopie mit mesangialen Immunablagerungen in der Immunfluoreszenz
Klasse II	mesangiale proliferative Lupusnephritis	nur mesangiale Hyperzellularität oder mesangiale Matrixexpansion in der Lichtmikroskopie mit mesangialen Immunablagerungen
Klasse III	fokale Lupusnephritis	aktive oder inaktive fokale, (segmentale oder globale) endo- oder extrakapilläre GNF, <50% der Glomeruli betreffend, typischerweise mit subendothelialen Immunablagerungen
Klasse IV	diffuse Lupusnephritis	aktive oder inaktive diffuse, (segmentale oder globale) endo- oder extrakapilläre GNF, >50% der Glomeruli betreffend, mit diffusen subendothelialen Immunablagerungen
Klasse V	membranöse Lupusnephritis	globale oder segmentale subepitheliale Immunablagerungen
Klasse VI	fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis	>90% der Glomeruli global sklerosiert

2.3.4 Charakterisierung des MRL/lpr Mausmodells der Lupusnephritis

Der MRL/lpr (MRL/MPJ Fas^{lpr/lpr}) Mausstamm ist ein etabliertes Tiermodell des SLE, das 1976 von Murphy und Roths entwickelt wurde. Aufgrund der spontanen *lpr*(*lymphoproliferation*)-Mutation im *Fas*-Gen (*CD95*, *Apo1*) [29] wird das Apoptose-vermittelnde *Fas*-Genprodukt funktionell defizient exprimiert. Durch die Beeinträchtigung der Apoptose werden autoreaktive T-Lymphozyten im Thymus nicht eliminiert. In der Folge sind auch entsprechende autoreaktive B-Lymphozyten in der Lage zu proliferieren und große Mengen autoreaktiver Antikörper zu bilden. Im genetischen Hintergrund des MRL-Mausstammes manifestiert sich bei Vorliegen der *lpr*-Mutation ein lupusartiges Krankheitsbild, das mit humaner Lupusnephritis vergleichbar ist. Dieses ist durch das Auftreten von DNA-Autoantikörpern, zirkulierenden Immunkomplexen, Immunkomplexablagerungen, Komplement-aktivierung und Endorganschädigung mit Leukozyteninfiltration charakterisiert (Abbildung 6). Klinisch wird das Krankheitsbild der Mäuse bestimmt von massiver Lymphoproliferation und Glomerulonephritis. Die Lymphoproliferation zeigt sich in einer Vergrößerung der Lymphknoten und Splenomegalie [30]. Es existieren zwei MRL-Substämme, der MRL/lpr- (Abbildung 5) und der MRL+/+-Stamm, die sich durch das Vorliegen oder Fehlen der *lpr*-Mutation unterscheiden. Der MRL+/+-Stamm entwickelt auch ein Autoimmunsyndrom, jedoch beginnt dieses später und die Mäuse sterben erst im Alter von 24 Monaten.



Abbildung 5: Mausmodell der SLE.

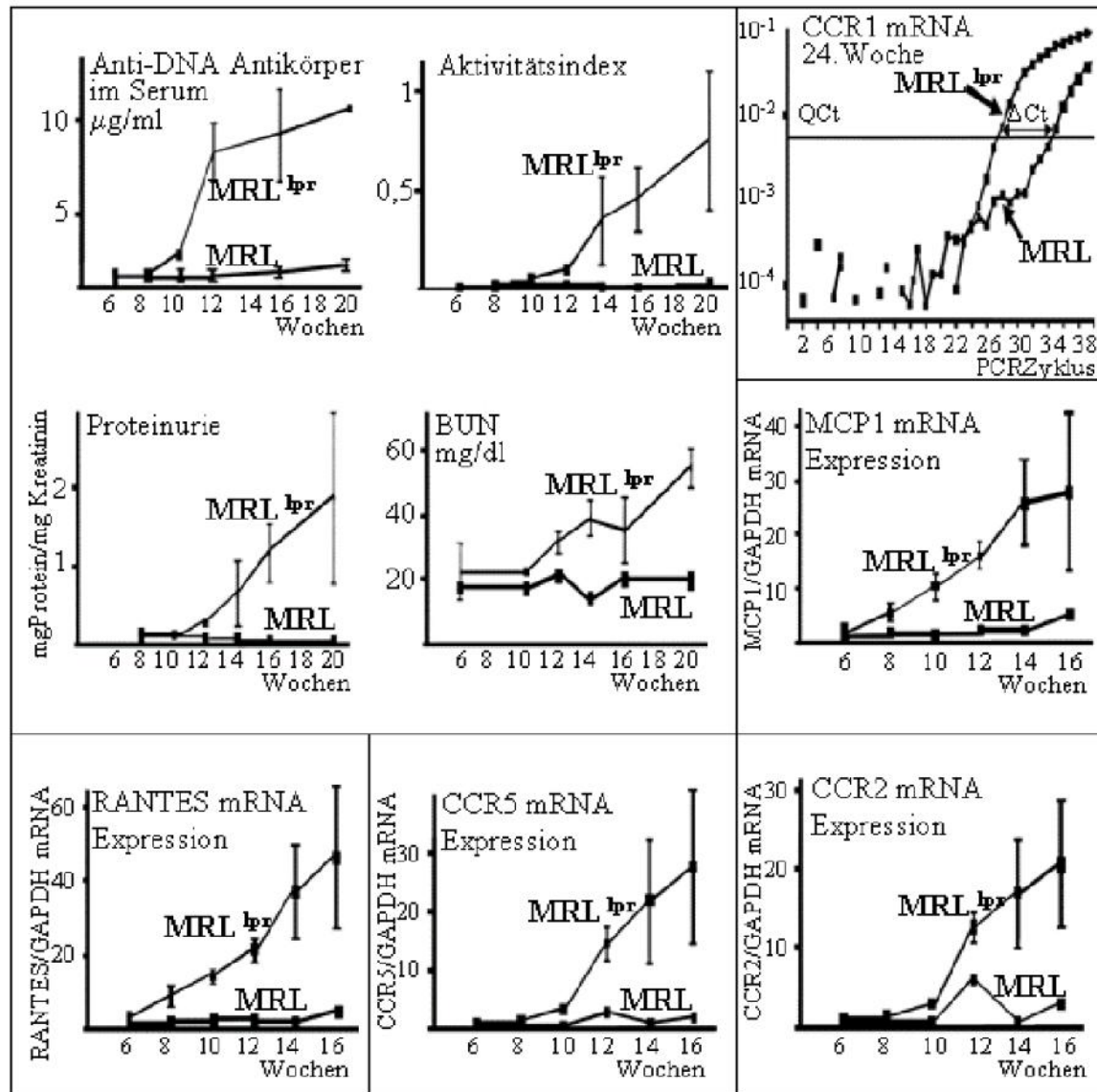


Abbildung 6: Erkrankungsverlauf bei MRL/lpr-Mäusen

MRL/lpr-Mäuse weisen polyklonale B-Zell-Aktivierung mit Hypergammaglobulinämie auf. Anti-dsDNA-Autoantikörper und Hypokomplementämie sind mit 12-16 Wochen nachweisbar. Klinische Symptome der Arthritis, der massiven Lymphadenopathie, der Splenomegalie, Vaskulitis und Immunkomplex- Glomerulonephritis treten im Alter von 16 Wochen auf. Eine gesteigerte Chemokinexpression (Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes, Ccl4/Mip-1 β , Cxcl10/lp-10) ist jedoch schon in der 8. Woche zu finden. Die Chemokinrezeptor-Expression (CCR1, 2, 5) steigt ab der 10.-12. Woche an. Des Weiteren sind in den Nieren von MRL/lpr-Mäusen ab der 14. Lebenswoche erhöhte mRNA-Spiegel von Il-1 β und dessen Rezeptor Il-1R α zu finden. Zudem zeigen die Mäuse ab diesem Alter auch erhöhte Expressionen von TNF, LT- β , IFN- β und IFN- γ . BUN: Blut-Harnstoff [30].

2.4 Das TNF/TNF-Rezeptorsystem als Ziel einer anti-inflammatorischen Therapie renaler Erkrankungen

2.4.1 TNF als Mediator entzündlicher Erkrankungen

Das proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF) ist ein 26 kDa großes Typ-II-Transmembranprotein und ein wesentlicher Mediator systemischer und lokaler Entzündungsreaktionen [31]. TNF spielt zugleich eine entscheidende Rolle bei angeborener und adaptiver Immunität, besonders in den Abwehrmechanismen des Wirtes gegen intrazelluläre Bakterien [32]. Neuere Studien weisen TNF eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Immun-Homöostase zu [33]. Das proinflammatorische Zytokin ist der Prototyp der TNF-Superfamilie, dessen Mitglieder für die Entstehung lymphatischer Gewebe und der Regulation der Immunantwort bedeutend sind [34]. Die lösliche TNF-Form entsteht durch proteolytische Prozessierung der membranständigen Pro-TNF-Extrazellulärsequenz, vorwiegend durch die Metalloproteinase *TNF-Alpha-Cleavage-Enzyme* (TACE/ADAM17) [35] [36]. Das so modifizierte, lösliche murine TNF-Molekül ist ein Homotrimer mit 52 kDa, das aus drei identischen 17 kDa Untereinheiten besteht.

Hauptsächlich aktivierte Makrophagen, aber auch Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten und viele andere Zellen exprimieren TNF als Antwort auf Entzündung, Infektion, Verletzung und Veränderungen des sie umgebenden Milieus [37] [31]. Ferner exprimieren Fibroblasten und intrinsische Nierenzellen wie Mesangialzellen, glomeruläre und tubuläre Epithelzellen TNF [37]. Dabei wird TNF nicht konstitutiv, sondern nur von aktivierten Zellen durch Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS), Interleukine (IL-1, IL-3), *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF), Interferone (IFN- γ) und TNF gebildet.

An der Spitze einer proinflammatorischen Zytokinkaskade stehend, nimmt TNF eine zentrale Stellung in der Pathogenese akuter und chronischer Entzündungen ein [38]. Eine wichtige pathophysiologische Funktion von TNF liegt in der Rekrutierung von Leukozyten an den Ort einer Gewebeschädigung oder Infektion (Abbildung 7). TNF führt hierbei zu verschiedenen Veränderungen auf vaskulären Endothelzellen und Leukozyten.

So reguliert TNF die Expression einer Reihe von Oberflächenantigenen, wie die humanen Leukozyten-Antigene (HLA), *intercellular adhesion molecules* (ICAM), *endothelial leukocyte adhesion molecules* (ELAM) und *vascular cell adhesion molecules* (VCAM) [39]. Diese interagieren mit leukozytär exprimierten Selektinen und Integrinen und ermöglichen eine Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten an der Gefäßwand. In Endothelzellen, Leukozyten und Parenchymzellen verschiedenster Organe bewirkt TNF die verstärkte Expression von Chemokinen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1. Erstere vermitteln gemeinsam mit Integrinen die Infiltration und Chemotaxis, gemeinsam mit Zytokinen die Aktivierung leukozytärer Effektorzellen im entzündeten Gewebe.

Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Entzündungskaskade konnte TNF als wichtiger interzellulärer Mediator bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie die der rheumatoiden Arthritis und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen identifiziert werden [31]. Inzwischen werden immunmodulatorische Therapien mit TNF-blockierender Wirkung klinisch höchst erfolgreich zur Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Psoriasis vulgaris angewandt [40] [41]. Ein wesentlicher Effekt der TNF-blockierenden Therapie scheint hierbei auf der geringeren Aktivierung des Gefäßendothels mit nachfolgend verminderter Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen zu beruhen [30]. Des Weiteren ist die TNF-Blockade assoziiert mit herabgesetzter Expression von anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und IL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Zur Therapie zugelassen sind unter anderem ein teilhumanisierter monoklonaler anti-TNF-Antikörper (Inflixmab), ein komplett humanisierter anti-TNF-Antikörper (Adulimab) und ein lösliches TNF-Rezeptor-IgG-Fusionsprotein (Etanercept) mit TNF blockierender Wirkung.

Allerdings vermittelt TNF neben proinflammatorischen Funktionen auch immunsuppressive Effekte. Daher ist nicht überraschend, dass die Anti-TNF-Behandlung bei entzündlichen Erkrankungen auch proinflammatorische Nebenwirkungen haben kann. Tatsächlich kommt es bei Patienten mit unter TNF-blockierende Therapie zum Auftreten von lupusartigen Krankheitsbildern.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der TNF-Biologie und betont gleichzeitig die Notwendigkeit für ein besseres Verständnis der Rolle von TNF und TNF-Rezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen. Das könnte dann zur Entwicklung von neuen, spezifischeren anti-inflammatorischen Therapien führen.

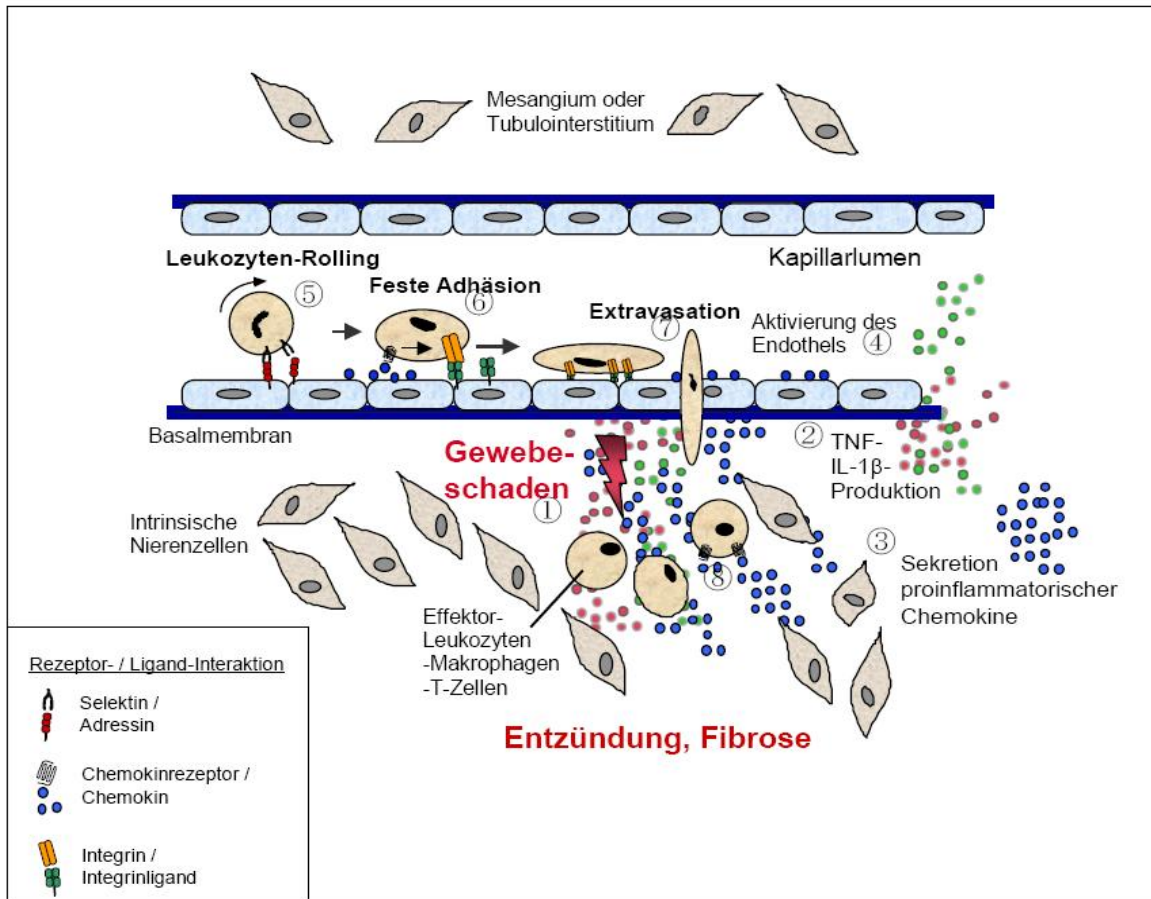


Abbildung 7: Leukozytär-endotheliale Interaktionen während der Leukozyteninfiltration: die Rolle von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Durch eine initiale Gewebeschädigung (1) werden intrinsische Parenchymzellen, in der Niere beispielsweise Mesangialzellen oder tubuläre Epithelzellen, zur Sekretion von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen (2) und Chemokinen (3) stimuliert. Endothelzellen des benachbarten Kapillarbettes werden hierdurch aktiviert (4), um Adhäsionsmoleküle wie Addressine, E-Selektin und Integrinliganden an der luminalen Oberfläche zu exprimieren. Zusätzlich sezernieren auch Endothelzellen inflammatorische Chemokine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden. Zirkulierende Leukozyten der Blutbahn interagieren mit den endothelialen Addressinen durch Selektine. Diese Interaktion (5) führt zum reversiblen Prozess des *Rolling*. Die rollenden Leukozyten gelangen hierdurch in engen Kontakt mit Chemokinen, die an der Endothelzelloberfläche gebunden sind (6). Nach Aktivierung durch ihre Chemokinliganden vermitteln aktivierte Chemokinrezeptoren rasche Konformationsänderungen von leukozytär exprimierten Integrinen, was eine irreversible, feste Adhäsion (6) der Leukozyten an die endotheliale Oberfläche erlaubt, auf der Integrin-Liganden, die interzellulären Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie, exprimiert werden. Dieser *Arrest* ist die Voraussetzung für die nachfolgende Diapedese der Leukozyten durch das Endothel (7). Infiltrierende Leukozyten werden anschließend einem Chemokingradienten folgend zum Ort der Parenchymschädigung geleitet. Die lokal sezernierten Chemokine aktivieren Effektorfunktionen der Leukozyten, unter anderem auch die Sekretion weiterer Chemokine (8). Dieser chronisch aufrechterhaltene Prozess mündet letztendlich in eine entzündliche Parenchymdestruktion und fibrotischen Gewebeumbau [31].

2.4.2 Vermittlung biologischer TNF-Effekte durch Tnfr1 und Tnfr2

Die biologischen TNF-Effekte werden durch die zwei unterschiedliche Oberflächenrezeptoren Tnfr1 (CD120a) und Tnfr2 (CD120b) vermittelt. Sie stellen Prototypen der inzwischen 29 Mitglieder umfassenden TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) dar [42]. Die beiden humanen membranständigen TNF-Rezeptoren wurden 1990 kloniert, die Maus-Rezeptoren folgten ein Jahr später [43]. Das Gen für Tnfr1 liegt auf dem Chromosom 12p13, während das Gen für Tnfr2 auf dem Chromosom 1p36 lokalisiert ist [44] [45]. Aufgrund ihrer molekularen Masse wurden sie auch als p55- (426 Aminosäuren) und p75-Rezeptor (439 Aminosäuren) bezeichnet. Es handelt sich um Typ-I-Membranproteine, die aufgrund der charakteristischen vier cysteinreichen Domänen (CRD) im extrazellulären Bereich namensgebend für die TNF-Rezeptor-Superfamilie waren [46]. Vergleichbar mit TNF existieren auch beide TNF-Rezeptoren in löslicher Form, die durch proteolytische Prozessierung durch die Metalloproteinase TACE/ADAM17 entstehen. Beide Rezeptoren können sowohl TNF als auch Lymphotoxin α (LT α , TNF β) binden und zeigen eine 28% Homologie hauptsächlich in der CRD-Region, während ihr intrazellulärer Bereich keinerlei Ähnlichkeiten aufweist [47]. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich tiefgreifend in ihrem Expressionsmuster, ihren physikalischen Bindungseigenschaften, ihrem nachgeschalteten Signalwegen und ihrer physiologischen Bedeutung. Während Tnfr1 bis auf wenige Ausnahmen, wie zum Beispiel Erythrozyten, auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv exprimiert wird, findet man Tnfr2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems und des Endothels, wo seine Expression streng reguliert wird [48]. Auch in der Affinität für lösliches (sTNF) und membrangebundenes TNF (memTNF) unterscheiden sich beide Rezeptoren. Tnfr1 kann von beiden, besonders aber von sTNF aktiviert werden, wohingegen besonders memTNF zu einer Aktivierung des Tnfr2 führt [49]. Die physiologische Relevanz der unterschiedlichen Affinität des Tnfr2 für sTNF und memTNF ist weithin unklar. Es wird angenommen, dass einige der Hauptwirkungen des TNF/Tnfr-Komplexes im Immunsystem eher von memTNF durch direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Immunzellen als durch sTNF hervorgerufen werden [47].

So vermittelt Tnfr2 nach seiner Aktivierung durch memTNF und unabhängig von Tnfr1 Zellproliferation und Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle [47].

Im Kontext von sTNF vermag Tnfr2 allerdings durch seine transienten Bindungseigenschaften und seiner schnellen Assoziations-/Dissoziations-Kinetik die lokale Konzentration an sTNF in unmittelbarer Umgebung der Zelle deutlich zu erhöhen und so für Tnfr1 den Zugang zu seinem Liganden zu erleichtern. Dieser Prozess des „*ligand passings*“ [50] weist auf eine modulierende Funktion von Tnfr2 für Tnfr1-vermittelte Signalwege hin.

Die meisten proinflammatorischen TNF-Effekte werden einer Tnfr1-Aktivierung und anschließenden NF- κ B oder AP-1-vermittelten Genexpression zugeschrieben. Die Tnfr1-Aktivierung kann jedoch auch an die gleichzeitige Expression von Tnfr2 gebunden sein [47].

2.4.2.1 Signaltransduktion durch Tnfr1

Nach Ligandenbindung initiieren die TNF-Rezeptoren die Signaltransduktion mittels zweier unterschiedlicher Klassen von Adapterproteinen, den sogenannten *Death-Domain* (DD)-Molekülen und den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) [47].

Tnfr1 liegt an der Zellmembran trimerisiert vor. Die Zusammenlagerung der einzelnen Rezeptormoleküle kommt dabei über eine homophile Interaktion der extrazellulären *preligand assembly domain* (PLAD) zustande [51]. Die Bindung des TNF führt zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Teils des Tnfr1 [52]. Durch diese Änderung können an die Todesdomäne (*Death Domain*, DD) des Tnfr1 Adapterproteine rekrutiert werden (Abbildung 8). Im inaktiven Zustand maskiert das Protein *silencer of death domain* (SODD) die Todesdomäne, um eine Selbstaktivierung des Rezeptors zu unterbinden [33]. Nach Aktivierung des Tnfr1 wird SODD abgebaut und das Adapterprotein *TNF-receptor associated death domain protein* (TRADD) bindet an der Todesdomäne des Rezeptors (Abbildung 8). TRADD stellt die zentrale Weiche in der Signalkaskade des Tnfr1 dar und kann im nächsten Schritt *TNF-receptor associated factor-2* (TRAF-2) und die Serin-Threonin-Kinase *receptor interacting protein-1* (RIP-1) binden [53].

TRAF-2 gehört einer Proteingruppe von inzwischen sechs bekannten Vertretern an, die jeweils an unterschiedliche Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie binden können [54].

RIP-1 und TRAF-2 ermöglichen zusammen die Rekrutierung und Aktivierung des Proteinkinase-Komplexes IKK (*I-κB kinase*) [55].

IKK phosphoryliert den Inhibitor von NF-κB (I-κB) und markiert damit diesen für die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau im Proteasom [56]. Nach dem Entfernen von I-κB von NF-κB kann NF-κB in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor verschiedener Gene fungieren. Während eine Aktivierung von NF-κB und MAP-Kinasen generell die Expression proinflammatorischer, proliferativer und antiapoptotischer Proteine zur Folge hat, kann bei der Signaltransduktion des Tnfr1 alternativ auch Apoptose durch Bindung von *fas-associated death domain* (FADD) an TRADD induziert werden [57]. Dabei wird wie im Fall der Fas-Signaltransduktion im nächsten Schritt Caspase-8 an FADD rekrutiert, die daraufhin autokatalytisch aktiv wird. Der so entstandene Komplex aus FADD und Caspase-8 wird als *death inducing signaling complex* (DISC) [58] bezeichnet. Allerdings konnte die Bindung des DISC an Tnfr1 mittels Immunpräzipitation unter physiologischen Bedingungen noch nicht nachgewiesen werden [59] [60]. Dies lässt darauf schließen, dass entweder die Assoziation von TRADD an Tnfr1 vergleichsweise schwach ist oder die Rekrutierung von DISC an Tnfr1 besondere, noch nicht bekannte Bedingungen benötigt [61]. Die bei der DISC-Bildung aktivierte Caspase-8 aktiviert ihrerseits Caspase-3, was letztlich zur Apoptose führt.

Wie molekularbiologische Forschungsergebnisse und die Erfahrungen aus *knock-out* Mausmodellen zeigen, werden die meisten der bekannten Wirkungen von TNF über Tnfr1 vermittelt. Obwohl die Signaltransduktion von Tnfr1 schon eingehend untersucht wurde, bleiben aber noch viele Fragen offen, vor allem die nach der Steuerung der Tnfr1-Signaltransduktion.

2.4.2.2 Signaltransduktion durch Tnfr2

Während die Signaltransduktion des Tnfr1 schon relativ gut untersucht ist, weiß man über die des Tnfr2 vergleichsweise wenig. Die Expression von Tnfr2 ist im Vergleich zu Tnfr1 stark reguliert. In manchen Zellen, wie zum Beispiel T-Zellen, scheint die Stimulation von Tnfr2 proliferativ zu wirken, in anderen Fällen unterstützt möglicherweise Tnfr2 synergetisch die apoptotische Signalkaskade von Tnfr1. Allerdings gibt es über den Mechanismus dieses Prozesses unterschiedliche Auffassungen [47].

Durch Bindung des Liganden erfolgt eine Konformationsänderung der Tnfr2-Trimere, die zur Rekrutierung und Trimerisierung von zytosolischen TRAF-2-Monomeren führt. Dabei ist TRAF-2 das Hauptadaptorprotein von Tnfr2 (Abbildung 8), das für die Aktivierung des NF- κ B- und AP-1-Signalweges und für die Initiierung der *c-Jun N-terminal kinase*-(JNK)-Kaskade verantwortlich zu sein scheint [62] [63] [64] [65]. Es konnte gezeigt werden, dass TRAF-2 für die TNF-induzierte Aktivierung von JNK verantwortlich ist [66]. Dies geschieht durch Aktivierung vorgeschalteter Kinasen, zum Teil auch unter der Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [67] [68]. Die Rekrutierung von TRAF-2 und RIP-1 ermöglicht zusätzlich auch die Aktivierung von p38, einer anderen MAP-Kinase [69]. Zu den vielfältigen Funktionen von p38 gehört neben der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auch die Verstärkung der IL-6-Produktion [70] [71] und vermutlich eine Beteiligung an der NF- κ B-Aktivierung [72].

Tnfr2 gehört zur Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren innerhalb der TNFRSF und ist deshalb in den meisten Zelltypen nicht in der Lage, die apoptotische Caspasen-Kaskade direkt zu aktivieren. Diese Initiierung der Apoptose geschieht möglicherweise indirekt über eine Tnfr2-TRAF-2-FADD-Interaktion [33]. Für T-Lymphozyten, die durch Antigenkontakt aktiviert sind, konnte eine indirekte TRAF-2-vermittelte Assoziation von Tnfr2 mit der DD-haltigen Proteinkinase RIP-1 nachgewiesen werden [73]. Des Weiteren ist Tnfr2 an wichtigen Prozessen der Angiogenese und bei bakterieller Infektion beteiligt [74] [75]. Neuere Arbeiten zeigen, dass Tnfr2 eine wichtige Rolle bei spezifischen zellulären Prozessen, insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen zukommt. So ist Tnfr2 auf T-Zellen der Lamina propria von Morbus-Crohn-Patienten hochreguliert [76], spielt eine Rolle bei der Pathogenese von HIV-Infektion [77] [78] und ist in antivirale Prozesse und die Induktion von Nekrose involviert [79].

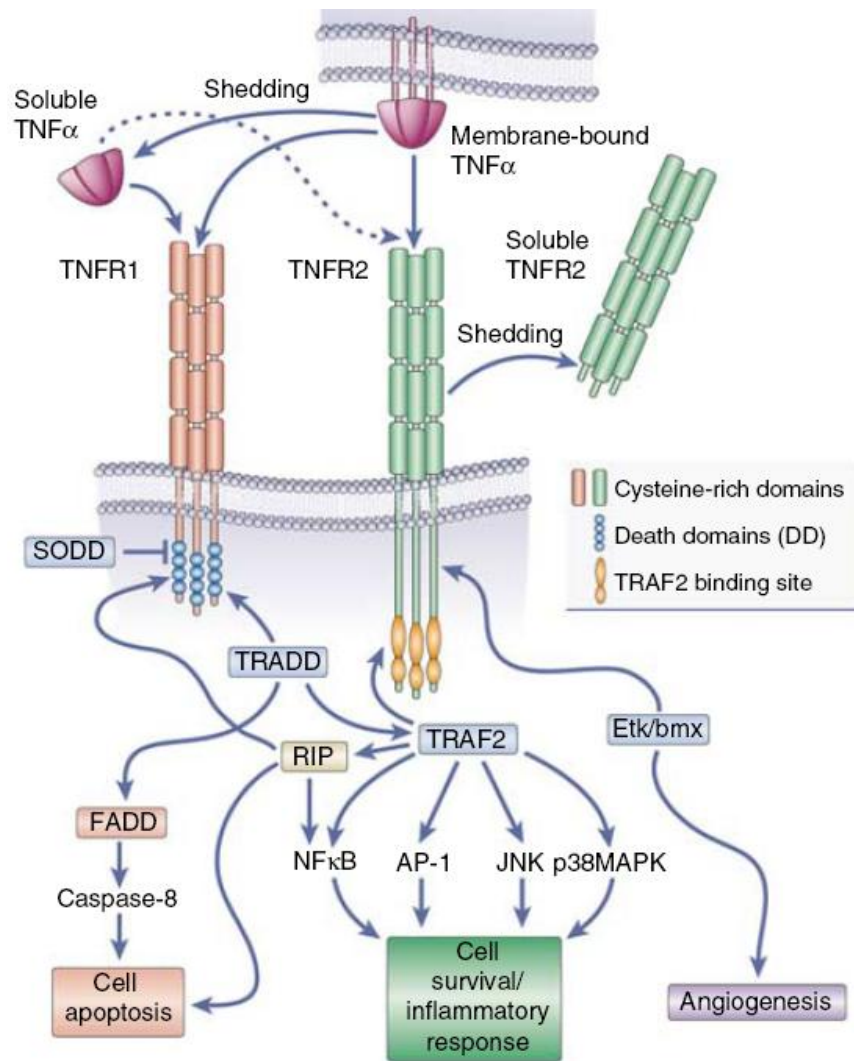


Abbildung 8: Signaltransduktion durch Tnfr1 und Tnfr2 [33].

2.4.3 Proinflammatorische und immunsuppressive Funktionen von TNF

Immunologisch ist TNF der Prototyp eines proinflammatorischen Zytokins. Allerdings vermittelt TNF neben seiner klassischen proinflammatorischen Rolle auch immunsuppressive Effekte, die Entzündungen begrenzen und Autoimmunreaktionen verhindern können. So induziert TNF die Produktion weiterer proinflammatorischer aber auch anti-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-1RA, IFN- γ , TGF- β ect.). Es steigert die Sekretion von Hormonen (Cortisol, Adrenalin, Noradrenalin, Insulin) sowie Akute-Phase-Proteinen, Leukotrienen und freien Sauerstoffradikalen. Die gesteigerte Produktion von IL-12 und IL-18 und die hierdurch induzierte IFN- γ -Produktion macht TNF zu einem Induktor der TH1-Immunreaktion [80].

In humanen intrinsischen Nierenzellen, wie zum Beispiel Mesangialzellen, induziert die TNF-Produktion inflammatorische Mediatoren wie GM-CSF, MCP-1, IL-6, Prostaglandin-E2 und TNF selbst, die eine renale Entzündung fördern [33]. Im Gegensatz dazu beruht die immunsuppressive Funktion von TNF unter anderem auf seiner Eigenschaft, in aktivierten Zielzellen Apoptose auszulösen. So konnte in mehreren Arbeiten eine TNF-abhängige Induktion von Apoptose in aktivierten CD8⁺-Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden [81] [82] [83]. TNF wirkt also einerseits aktivierend und proliferationsfördernd durch die Induktion von diversen Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1) und andererseits hemmend durch Induktion von Caspasen, die die Apoptose einleiten [84] [85] [86]. Tabelle 2 stellt einen Überblick über diese gegensätzlichen TNF-Funktionen dar.

Auch eine zunehmende Zahl klinischer und tierexperimenteller Daten weist auf diese gegensätzlichen Funktionen von TNF hin. So führt beim Menschen die Blockade des TNF-Signalweges mit Hilfe von anti-TNF-Antikörpern wie Infliximab oder den löslichen TNF-Rezeptoren wie Etanercept bei der Mehrzahl der Patienten zu einer erheblichen Senkung der Krankheitsaktivität, verhindert das Fortschreiten der Erkrankung und ist heute eine wirkungsvolle Therapieoption [87]. Allerdings treten unter TNF-blockierender Therapie mit Infliximab bei über 14% der Patienten mit rheumatoiden Arthritis Anti-dsDNA-Antikörper auf [88].

Bei Patienten mit multipler Sklerose führte die TNF-Blockade zur Immunaktivierung und Verschlechterung der Erkrankung [89] [90].

Auch in Mäusen mit experimenteller allergischer Enzephalitis (EAE), einem Tiermodell der multiplen Sklerose, konnte eine TNF-abhängige Regression der Myelinspezifischen Autoreaktivität nachgewiesen werden [91]. Entsprechend bewirkte das Fehlen von TNF in TNF-defizienten Tieren eine anhaltende Verschlechterung der Erkrankung, während bei TNF-positiven Kontrollmäusen eine Remission eintrat [91]. Zusammenfassend geht aus bisherigen Studien hervor, dass die TNF-Effekte im spezifischen Zusammenhang von jeder entzündlichen Erkrankung und dem beteiligten Gewebe betrachtet werden müssen.

Tabelle 2: Proinflammatorische versus immunsuppressive Funktionen von TNF [33].

Proinflammatory	Immunoregulatory
<i>Blood vessels activation</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Vasodilation ● Increase of vascular permeability ● Expression of adhesion molecules: ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin 	<i>Organogenesis of secondary lymphoid organs</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Formation and maturation of germinal centers ● Maturation of follicular dendritic cells
<i>Cell activation</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Activation/priming of leukocytes ● Induction of expression of MHC I and II ● Proliferation of fibroblasts and mesangial cells 	<i>Maintenance of central and peripheral tolerance</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Thymocyte apoptosis ● Activation induced T cell apoptosis ● Induction of C1q and serum amyloid P components
<i>Induction of chemokines, cytokines, and other inflammatory mediators</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Release of cytokines and chemokines: MCP-1, RANTES, IL-1, IL-6, IL-8, complement component C3 ● Release of prostaglandins, leukotrienes, nitric oxide, and reactive oxygen species ● Upregulation of matrix metalloproteinases 	<i>Immunosuppression</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Downregulation of TCR-signaling and T-cell responsiveness ● B-cell sensitization to FAS-mediated apoptosis
<small>ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted (CCL5); TCR, T-cell receptor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.</small>	

2.4.4 TNF bei entzündlichen Nierenerkrankungen

Die renale TNF-Expression ist sowohl bei der murinen als auch in humanen Glomerulonephritiden induziert [92] [93] [94] und korreliert mit einer Erhöhung der Serum- und Urin-Spiegel von TNF [95] [96]. In TNF-defizienten Mäusen sind Proteinurie, glomeruläre Schädigung, renale Leukozyteninfiltration (T-Zellen und Neutrophilen) [97] [98] und die Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle im Verlauf einer IK-GN wie der nephrotoxischen Serumnephritis deutlich reduziert [97]. Umgekehrt verursacht die systemische Gabe von TNF in Kaninchen eine glomeruläre Schädigung [99]. Auch im Rattenmodell der nephrotoxischen Serumnephritis verstärkt TNF-Gabe die Glomerulonephritis [100]. In MRL/lpr-Mäusen steigert die renale TNF-Expression die lokale Akkumulation von Makrophagen [101].

Untersuchungen an chimären Mäusen nach Knochenmarktransplantation ergaben, dass das durch intrinsische Nierenzellen, nicht jedoch das durch infiltrierende Leukozyten gebildete TNF für den Krankheitsverlauf entscheidend ist [102]. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass TNF lokal in entzündeten Glomeruli durch Mesangialzellen, Podozyten und infiltrierende Makrophagen produziert werden kann.

Auch die beiden TNF-Rezeptoren (Tnfr1 und Tnfr2) werden sowohl beim Menschen als auch in der Maus glomerulär exprimiert. Aus Arbeiten von Vielhauer et al. [103] ging hervor, dass im Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis die glomeruläre Expression von Tnfr2 essentiell für die Entwicklung einer IK-GN ist. So entwickelten Tnfr2-defiziente Mäuse über den gesamten Krankheitsverlauf keine Proteinurie, keine glomeruläre Schädigung, deutlich verminderte glomeruläre Ablagerungen von Komplement C3 und keine pathologischen Leukozyteninfiltrate. Die systemische Immunantwort (Antikörperproduktion und zelluläre Hypersensitivitätsreaktion) war dabei in Tnfr2-defizienten Mäusen intakt. Zudem konnte immunhistologisch die Tnfr2-Expression glomerulären Endothelzellen und möglicherweise Mesangialzellen zugeordnet werden [103].

Im Gegensatz dazu zeigten Tnfr1-defiziente Mäuse nur in der frühen Phase der Nephritis (Woche 1 und 2) einen abgeschwächten Krankheitsverlauf, der mit Verminderung der für die Induktion der Nephritis erforderlichen systemischen Immunantwort einherging.

Diese Befunde decken sich mit der beschriebenen Rolle von TNF bei der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen [89]. Zu späteren Zeitpunkten entwickelten Tnfr1-defiziente Tiere dagegen eine Wildtypmäusen vergleichbare Nephritis. Kürzlich publizierte Daten weisen auch eine gesteigerte Expression beider TNF-Rezeptoren in aktivierten oder geschädigten Podozyten nach [104]. In humanen Biopsiestudien konnte die glomeruläre Expression der beiden TNF-Rezeptoren bei Glomerulonephritiden, für Tnfr1 insbesondere bei der Lupusnephritis auf Proteinebene nachgewiesen werden [93].

2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Tierexperimentelle und humane Studien belegen die pathogenetische Rolle des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) bei der glomerulären Entzündung. Allerdings vermittelt TNF neben proinflammatorischen auch immunsuppressive Effekte. Unter TNF-blockierender Therapie treten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lupusartige Krankheitsbilder auf. Daher ist die Anwendbarkeit einer TNF-Blockade bei immunologisch bedingten Glomerulonephritiden wie der Lupusnephritis fraglich.

Die biologischen Effekte von TNF werden durch die zwei unterschiedlichen, funktionell eigenständigen Oberflächenrezeptoren Tnfr1 und Tnfr2 vermittelt, die auf allen Zellen des Organismus exprimiert werden können. Der Nachweis einer zentralen proinflammatorischen Funktion eines einzelnen TNF-Rezeptors in der glomerulären Entzündungskaskade könnte die selektive Tnfr-Blockade als therapeutische Strategie zur Behandlung der Lupusnephritis identifizieren, die gleichzeitig immunsuppressive TNF-Effekte nicht antagonisiert.

Vorarbeiten unserer Gruppe belegen für renal, aber nicht leukozytär exprimierten Tnfr2 eine essentielle funktionelle Rolle im Modell einer IK-GN, der toxischen Serumnephritis. Dabei konnte eine endotheliale und möglicherweise mesangiale Tnfr2-Expression im Glomerulus bestätigt werden [103]. Allerdings werden die meisten proinflammatorischen Effekte von TNF einer Tnfr1-Aktivierung und anschließender NF- κ B- oder AP-1-vermittelter Genexpression zugeschrieben [105].

Die Tnfr1-Aktivierung kann jedoch auch an die gleichzeitige Expression von Tnfr2 gebunden sein [105]. Der zugrunde liegenden Mechanismen der Tnfr2-abhängigen glomerulären Schädigung im Modell der Nephrotischen Serumnephritis ist dagegen unklar.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung Tnfr1- und Tnfr2-abhängig exprimierter Entzündungsmediatoren in Maus-Glomeruli. Dabei wurde die Expression glomerulärer Entzündungsmediatoren sowohl in gesunden Mausnieren *in vivo* als auch an isolierten Maus-Glomeruli *ex vivo* untersucht. Zusätzlich sollte die funktionelle Rolle beider Tnfr *in vivo* in einem murinen Modell der Lupusnephritis untersucht werden. Im Einzelnen wurden folgenden Fragestellungen bearbeitet:

2.5.1 Analyse der Tnfr-Expression und Tnfr-abhängig exprimierter Entzündungsmediatoren *in vivo*

- Transkriptionsanalyse von TNF-Rezeptoren, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in gesunden Mausnieren
- Transkriptionsanalyse von TNF-Rezeptoren, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen nach intraperitonealer TNF-Applikation *in vivo*

2.5.2 Identifizierung Tnfr-abhängig exprimierter Entzündungsmediatoren in Glomeruli *ex vivo*

- cDNA-*Microarray*-Expressionsanalyse von TNF-stimulierten Wildtyp- und Tnfr-defizienten Maus-Glomeruli
- Verifizierung ausgewählter Tnfr-abhängig regulierter Gene aus dem *Microarray*-Experiment
- Protein-Expression von ausgewählten Tnfr-abhängig exprimierten Entzündungsmediatoren in Maus-Glomeruli

2.5.3 Analyse Tnfr-abhängiger Expression von Entzündungsmediatoren in primären glomerulären Mesangialzellen

- Charakterisierung der primären glomerulären Mesangialzellen
- Transkriptionsanalyse von TNF-Rezeptoren, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen nach TNF-Stimulation *in vitro*

2.5.4 Die Rolle der TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis

- Rückkreuzung der Tnfr-defizienten Mausstämmen in den MRL/lpr-Hintergrund
- Phänotypanalyse der Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Mikroskope Leica DC 300F L Olympus BX50	Leica Microsystems, Cambridge, UK Olympus Microscopy, Hamburg
Spectrophotometer Beckman DU® 530	Beckman Coulter, Fullerton, USA
TaqMan Sequence Detection System ABI prism™ 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA-Wascher Microplate-Washer Elx50	Biotek, Bad Friedrichshall
Inkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, München
Zentrifugen Heraeus, Biofuge primo Heraeus, Minifuge T Heraeus, Sepatech Biofuge A	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau VWR International, Darmstadt Heraeus Sepatech, München
Waagen Analytische Waage, BP 110 S Mettler PJ 3000	Sartorius, Göttingen Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Sonstige Geräte Cryostat RM2155 Cryostat CM3000 Mikrotom HM 340E pH-Meter WTW Thermomixer 5436 Vortex Genie 2™ Wasserbad HI 1210 MidiMACS Magnet	Leica Microsystems, Bensheim Leica Microsystems, Bensheim Microm, Heidelberg WTW GmbH, Weilheim Eppendorf, Hamburg Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz Leica Microsystems, Bensheim Milentyl Biotec, Bergisch Gladbach BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

3.1.2 Tierhaltung

Makrolone Typ II Käfige	Tecniplast, Hamburg
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien	
Aceton	Merck, Darmstadt
Albustix Teststreifen	Bayer
APES	Sigma, Deisenhofen
BSA, Bovines Serum Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Lab., USA
DAPI	Vector Lab., Burlingame, USA
DEPC	Fluka, Buchs, Schweiz
DNase Typ III	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Calbiochem, SanDiego, USA
Einbettmedium	Jung, Leica Microsystems, Nussloch
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACSFlow	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
HCl (5N)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I	Roth, Karlsruhe
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Trypan Blue	Sigma, Deisenhofen
Tween	Fluka, Buchs, Switzerland
Wasserstoffperoxid	DAKO, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt
Alle anderen analytisch verwendeten Reagenzien sind kommerziell erhältlich bei Invitrogen, Sigma oder Roth.	

Chemikalien für die Genotypisierung der Mäuse	
1kb DNA <i>Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
dNTP	GE Healthcare, Freiburg
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
Superscript	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Minerva BioLabs, Berlin
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalien und Material für die Zellkultur	
DMEM-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FSC, Fötale Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
ITS, Insulin, Transferrin, Selenium	Roche Diagnostics, Mannheim
Kollagenase A	Roche Diagnostic, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI-1640-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Trypsine/EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Chemikalien für molekularbiologische Techniken	
ELISA-Kit _Albumin	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
ELISA-Kit _Mcp-1	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
ELISA-Kit _Ccl5	R&D Systems
ELISA-Kit _Cxcl10	R&D Systems
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
qRT-PCR Primers	PE Biosystems, Weiterstadt
TaqMan® universal PCR master mix	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.4 Plastikwaren

Einfrierboxen	Nalge Nunc, Wiesbaden
Einfrier-Röhrchen	Nalge Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturplatten	Greiner, Nürtingen
Petrischalen 94 mm, 60 mm, 35 mm	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (Eppis) 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Tubes 15 und 50 mL	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.2 Methoden

3.2.1 Glomerulus-Isolation und Zellkultur

3.2.1.1 Paramagnetische Glomeruli-Isolation

Um die Rolle der beiden TNF-Rezeptoren in Maus-Glomeruli und erweiternd im Tubulointerstitium zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein von Takemoto et al. [106] beschriebenes, leicht modifiziertes paramagnetisches Isolationsverfahren verwendet. Diese Methode ermöglichte eine schnelle und effiziente Isolation von Glomeruli mit hohem Reinheitsgrad und minimaler Kontamination mit anderem Nierengewebe. Die Glomeruli und das Tubulointerstitium wurden aus Wildtyp, *Tnfr1*^{-/-}, *Tnfr2*^{-/-} und *Tnfr1,2*^{-/-} Mäusen (vgl. Punkt 3.2.6) isoliert. Alle für dieses Experiment verwendeten Versuchstiere befanden sich im C57BL/6J-Hintergrund.

In Abbildung 9 wird diese Methode schematisch dargestellt. 200 µl (8×10^7) M-450 *Epoxy Dynabeads* (DynaL Invitrogen Corporation, Karlsruhe) wurden entsprechend den Herstelleranweisungen geblockt, mit 40 ml bei 37°C vorgewärmter PBS-Lösung (*phosphate buffered saline*, Pan Biotech, Aidenbach) gemischt und in ein Perfusionsgerät (Herstellung nach Instruktionen von Dr. A. Blutke) überführt. *Dynabeads* weisen einen Durchmesser von 4,5 µm (Abbildung 9, A) auf und sind aus einem Kern aus magnetisierbarem Material und einer Kunststoffummantelung aufgebaut. Während des Perfusionsvorgangs verringert die glatte Oberfläche der Beads den direkten Schaden des Gewebes und schützt dieses vor giftiger Belastung durch Eisen. Tiefnarkotisierte Mäuse wurden thorakotomiert, das Herz am nun toten Tier freipräpariert und die Vena cava zum Perfusionsabfluss durchtrennt. Die Perfusion (Abbildung 9, B) erfolgte durch die linke Herzkammer unter anfänglichem Perfusionsdruck von 20 mmHg und langsamer Steigerung auf 60 mmHg. Dieser Wert wurde bis zum Abschluss der Perfusion beibehalten, so dass die Beads unter konstantem Perfusionsdruck in die Glomerulumkapillaren gelangten und diese embolisieren konnten (Abbildung 9, C). Bei erfolgreicher Perfusion nehmen die Nieren und die Leber der Mäuse eine helle Farbe an.

Die perfundierten Nieren wurden den toten Tieren entnommen, von der Nierenkapsel befreit und mit Hilfe eines Skalpells in 1 mm³ große Stücke zerkleinert. Das zerkleinerte Nierengewebe wurde für 30 min bei 37°C (Biometra TB1 Thermoblock, Whatman, Deutschland) mit Kollagenase A (1 mg Kollagenase A/ml, *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS, Roche, Deutschland und Invitrogen, Deutschland) in 2 ml Röhrchen mit rundem Boden (Eppendorf AG, Deutschland) verdaut (Abbildung 9, D). Das verdaute Gewebe wurde sanft durch die Mitte eines 100 µm Zellsiebes (Falke, Deutschland) mit Hilfe eines Pistills einer 5 ml Spritze ohne Dichtung durchgedrückt (Abbildung 9, E). Anschließend wurde das Zellsieb mit 7 ml 4°C kaltem PBS (pH 7,4) gespült. Die Zellsuspension wurde in ein 12 ml Röhrchen (Techno Plastikprodukte AG, Schweiz) überführt und für 7 Minuten in ein Magnetfeld (Zellen-Trennungs-Magnet BD-I Magnet™, BD-Biowissenschaften, Deutschland) gesetzt. Die Glomeruli mit embolisierten Beads haften an der dem Magnet zugewandten Seite des 12 ml Röhrchens (Abbildung 9, F), sodass das restliche, nichtglomeruläre Nierengewebe wie das Tubulointerstitium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen werden konnte. Die tubulointerstielle Fraktion (erster Waschgang) wurde für 3 min, 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 600 µl RLT-Puffer für die spätere RNA-Isolation bei -20°C gelagert. Die in den 12 ml Röhrchen verbliebenen Glomeruli wurden in 10 ml 4°C kaltem PBS resuspendiert und einem weiteren Waschgang unterzogen. Anschließend wurde die Suspension durch ein neues 100 µm Zellsieb filtriert, diesmal allerdings unter Verzicht des Pistill-Einsatzes und für 5 Minuten in ein Magnetfeld gesetzt. Die Glomeruli wurden erneut vom Magnet angezogen und der zweite Überstand, der zu 95% aus tubulärem Nierengewebe bestand, wurde ebenfalls vorsichtig abgenommen und wie die tubulointerstitielle Fraktion in 600 µl RLT-Puffer für die spätere RNA-Isolation bei -20°C aufbewahrt. Die Glomeruli wurden für weitere drei Male mit 10 ml PBS gewaschen und die Reinheit der glomerulären Fraktion mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Nach dem letzten Waschschrift wurden schließlich auch die Glomeruli in einem 2 ml Röhrchen mit rundem Boden gesammelt, in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und für eine RNA-Isolation bei -20°C aufbewahrt. Pro Niere wurden mit dieser Methode etwa 10.000 hochreine Glomeruli isoliert.

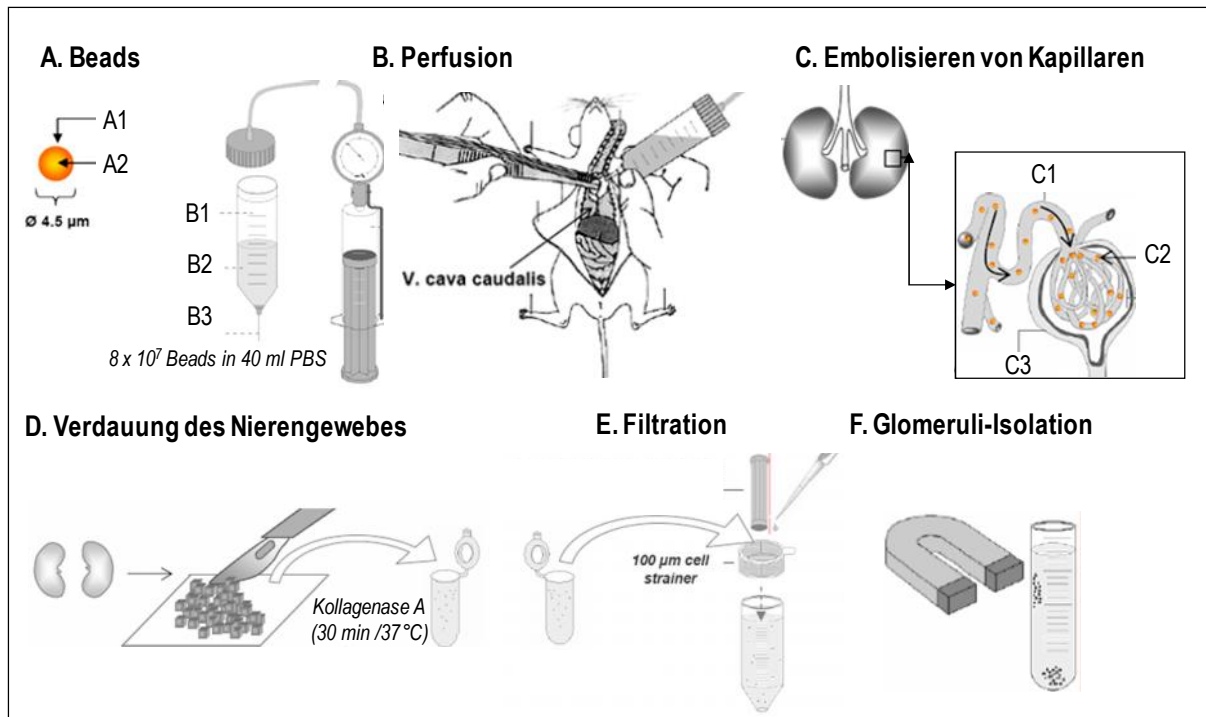


Abbildung 9: Paramagnetische Glomeruli-Isolation (A-F) [106].

3.2.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung von glomerulären Zelllinien, isolierten Glomeruli und primären Mesangialzellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem Brutschrank bei 37°C und einem 5% CO₂/Luft-Gemisch. Die Passage und die Stimulationsexperimente der Zellkulturen wurden ausschließlich unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Dabei wurde die Oberfläche der Werkbank und sämtliche Gebrauchsgegenstände wie Pipetten, Schalen, Mediumflaschen usw. vor Ingebrauchnahme zusätzlich desinfiziert.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl

Um den Anteil vitaler Zellen nach einer Zelltrennung oder Zellisolation aus dem Gewebe zu bestimmen, wurden Vitalitätstests vorgenommen. Die meisten Vitalitätstests stützen sich auf die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei welcher der Farbstoff Trypanblau, für die Zellmembran normalerweise nicht durchlässig, aufgenommen wird.

Folglich erschienen die abgestorbenen Zellen im Mikroskop tiefblau gefärbt im Gegensatz zu vitalen Zellen, die Trypanblau nicht aufnehmen und daher ungefärbt bleiben.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert aus vier Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Zellen einfrieren zu können, wurden sie unter sterilen Bedingungen von der Kulturschale mit 1,5 mM EDTA/PBS-Lösung abgelöst und für 3 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in einem Einfriermedium, bestehend aus FCS mit 10% DMSO, durch wiederholtes Ansaugen und Abwerfen mittels einer Pipette resuspendiert. Jeweils 1 ml Zellsuspension (Konzentration von etwa 1 Mio Zellen/ml) wurde in ein vorbeschriftetes Kryoröhrchen überführt und in einer Isopropanol-Kühlbox bei -80°C für 24 Stunden gelagert. Anschließend wurden die Zellen im Flüssigstickstoff für die Lagerung über einen längeren Zeitraum aufbewahrt.

Die aufzutauenden Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Die flüssig gewordene Zellsuspension wurde in ein entsprechendes, ebenfalls bei 37°C aufgewärmtes Medium in eine Zellkulturschale unter sterilen Bedingungen überführt. Das Medium wurde nach 24 Stunden erneut gewechselt.

3.2.1.5 Kultivierung glomerulärer Endothel- und Mesangialzelllinien

Die murine glomeruläre Endothelzelllinie stammt aus einer tsA58 *Immorto*-Maus [107] und wurde von Dr. Nese Akis (Uludag University, Bursa, Turkey) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Medium aus DMEM mit GlutaMax (Invitrogen), 10% FCS (FCS; Biocrom, Berlin), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich).

Die Endothelzellen wurden durch positive Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert für CD31 (Klon MEC 13.3, BD Biosciences), von-Willebrand-Faktor (Klon H-300, Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, CA, USA) und Zytokeratin 18 (Klon RGE53, Chemicon International, Hampshire, UK).

Die murine Mesangialzelllinie wurde uns ursprünglich von Prof. Dr. Schlöndorff überlassen und in RPMI-Medium, mit 2,5% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert [108].

Beide kultivierten Zelllinien wurden nach Erreichen einer 80% Konfluenz für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 5 (Endothelzelllinie) oder 24 Stunden (Mesangialzelllinie) mit unterschiedlichen TNF- (Invitrogen) und/oder IFN-γ-Konzentrationen (PeproTec, Rocky Hill, NJ, USA) stimuliert.

3.2.1.6 Kultivierung, Stimulation und Ernte der Glomeruli

Nach erfolgreicher paramagnetischer Isolation der Glomeruli aus C57BL/6J Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen unter sterilen Bedingungen wurden 5000 intakte Glomeruli in 6-Well-Platten mit 3 ml RPMI 1640-Medium mit 15% FCS, 15 mM HEPES-Puffer (Invitrogen), 0,66 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in Zellkultur aufgenommen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Glomeruli für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium (Kulturmedium für Glomeruli ohne FCS) kultiviert. Schließlich erfolgte die Stimulation der Glomeruli für 12 oder 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen murinen TNFs. Die Glomeruli wurden nach entsprechender Inkubationsdauer geerntet. Dazu wurde der gesamte Inhalt des jeweiligen Wells in ein 15 ml Falcon überführt, die Glomeruli-Suspension für 3 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein neues, beschriftetes Röhrchen abpipettiert und für die ELISA-Auswertung bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet (Glomeruli) wurde in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und für die RNA-Isolation bei -20°C aufbewahrt.

3.2.1.7 Gewinnung und Kultivierung von primären Mesangialzellen

Die Isolation von primären Mesangialzellen erfolgte aus sechs bis acht Wochen alten C57BL/6J Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen. Hierzu wurden nach der paramagnetischen Glomeruli-Isolation aus den Mausnieren (Abschnitt 3.2.1.1) Glomeruli in vorgewärmtes RPMI-Medium 1640 mit 20% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 1% ITS (5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferin, 5 ng/ml Selenium; Roche, Mannheim) aufgenommen. 2×10^4 Glomeruli wurden in 6-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. In den nachfolgenden drei bis fünf Tagen konnte ein radiäres Auswachsen von Epithel- und Mesangialzellen aus den Glomeruli beobachtet werden. Nachdem alle Glomeruli vollständig adhäriert wurden folgte der erstmalige Mediumwechsel. Innerhalb der nächsten zwei bis drei Wochen wurden die glomerulären Epithelzellen durch die konfluent gewachsenen Mesangialzellen verdrängt. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen für 10 min mit 1,5 mM EDTA/PBS-Lösung vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Um die EDTA-Aktivität zu stoppen wurde das gleiche Volumen an Wachstumsmedium zu dem Ablösungsmedium zugegeben. Die Zellen wurden geerntet und für 3 min und 1200 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde im Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen in die nächste Passage 1:2 ausgesät. In der Regel benötigten die Zellen zwei bis drei Tage um eine Konfluenz von 80-90% zu erreichen. Primäre Mesangialzellen wurden bis zur 5. Passage kultiviert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.1.8 Subkultivierung von Zellen

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 10 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter der Einwirkung von 1.5 mM EDTA/PBS-Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Dabei begannen die Zellen ihren Zell-Zell-Kontakt zu verlieren, lösten sich vom Untergrund ab und bekamen ihre ursprüngliche rundliche Form. Zur Beendigung der Wirkung wurde 10 ml FCS-haltiges Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 200 g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert.

3.2.1.9 Charakterisierung der primären glomerulären Mesangialzellen

Für die Färbung wurden Zellen auf sterilen Deckgläschen (*Coverslips*) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% im entsprechenden Medium kultiviert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen für 5 min mit 4°C kaltem PBS wurden sie für 10 min in 3,7% Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Erneut wurden die Zellen zweimal für 3 min in PBS/0,2% Triton X-100 gewaschen. Durch anschließende Inkubation der Zellen für 10 min in 0,3% Triton X-100/2% FCS/PBS-Lösung wurden die Zellmembranen permeabilisiert und damit für die eingesetzten Antikörper durchlässig gemacht.

Zur Verhinderung unspezifischer Antikörper-Bindungen wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in 2% FCS/PBS-Lösung inkubiert. Es folgte die Inkubation über Nacht mit primären Antikörpern, die gegen die Zielproteine gerichtet waren (Tabelle 3). Nach wiederholtem Waschen mit PBS/0,2% Triton X-100 wurden die Zellen mit dem fluorochromkonjugierten Zweitantikörper für eine Stunde lichtgeschützt inkubiert (Tabelle 3). Zum Einbetten wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen Einbettmedium mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Zellkernfärbung, Vector Laboratories) gegeben. Zur Versiegelung der Proben wurde Nagellack verwendet.

Tabelle 3: Überblick über die zur charakterisierung primärer Mesangialzellen verwendeten Antikörper.

Primärer Antikörper (1:50 in PBS)	Sekundärer Antikörper (1:100 in PBS)
Maus anti-Desmin Ak <i>Clone</i> : RD301 BD/Becton Dickinson, Deutschland	Alexa 488-markierter Ziege anti-Maus Ak Invitrogen, Deutschland
Maus anti- <i>Smooth Muscle Actin</i> Ak <i>Clone</i> : 1A4 Dako, Denmark	Alexa 488-markierter Ziege anti-Maus Ak Invitrogen, Deutschland
Ratte anti-Maus CD31 Ak <i>Clone</i> : MEC 13.3 BD/Becton Dickinson, Deutschland	FITC-markierter Zige anti-Ratte Ak BD/Becton Dickinson, Deutschland
Maus anti-Zytokeratin 18 Ak <i>Clone</i> : RGE53 Chemicon International, UK	Alexa 488-markierter Ziege anti-Maus Ak Invitrogen, Deutschland
Kaninchen anti-vWF (von Willebrand-Faktor) Ak <i>Clone</i> : H-300 Santa Cruz Biotechnology	Alexa 488-markierter Ziege anti-Kaninchen Ak Invitrogen, Deutschland

3.2.1.10 Gewinnung von Splenozyten

Die Splenozyten wurden aus der Milz folgender Mausstämmen gewonnen: Wildtyp, *Tnfr1*^{-/-} und *Tnfr2*^{-/-} MRL/lpr-Mäuse der N6-Generation (vgl. Abschnitt 3.2.7.3, Abbildung 11). Hierzu wurde die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon gepresst. Das Zellsieb wurde mit gekühltem PBS gründlich nachgespült und die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml gekühltem TCA-Puffer resuspendiert und für exakt 5 min im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Hierbei wurden unter Einwirkung der TCA-Puffer die Erythrozyten lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml gekühltem MACS-Puffer gestoppt und die Zellsuspension erneut durch ein 70 µm Zellsieb filtriert. Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht.

TCA-Puffer, (Tris-Ammoniumchlorid-Puffer)	50 ml Tris-Puffer
	450 ml 0,83% Ammoniumchlorid
	pH 7.2

MACS-Puffer,	2 mM EDTA
	0,5% BSA
	pH 7.2

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation

RNA ist im Gegensatz zu DNA sehr instabil. Daher war es wichtig bei der Isolation von RNA die sehr stabilen RNasen möglichst schnell von der RNA zu trennen. Hierfür sollten bei der RNA-Isolierung Bedingungen herrschen, welche die noch verbleibende RNase-Aktivität limitieren oder ganz eliminieren. Die RNA-Isolierung aus Glomeruli und primären Mesangialzellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) nach Herstellerangaben. Auf diese Weise wurde die Gesamt-RNA gewonnen und entweder direkt für weitere Experimente verwendet (zum Beispiel: Umschreiben in cDNA) oder sie wurde bei -80°C aufbewahrt.

Produkt	Firma	Artikelnummer
<i>RNeasy Protect Mini Kit</i> (250)	Quiagen	74126

3.2.2.2 Bestimmung der RNA-Reinheit und der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe von „*Quanti-it™ RNA Assays Kits*“ nach Herstellerangaben oder mittels eines Spektrometers bestimmt.

Produkt	Firma	Artikelnummer
<i>Quanti-it™ RNA Assays Kits</i>	Invitrogen	Q32852

Photometrische Konzentrationsbestimmung: Die Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt, indem bei $\lambda=260$ nm (DNA) und $\lambda=280$ nm (Proteine) die Extinktion gemessen wurde. Ist der Koeffizient kleiner als 1,8 bis 2 ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) kontaminiert. In diesem Fall sollte die RNA erneut gereinigt werden.

Da OD = 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl entspricht, lässt sich die RNA-Konzentration photometrisch wie folgt bestimmen:

$$\text{Konzentration [ng/μl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Bestimmung der Gesamt-RNA-Qualität für das *Microarray*-Experiment: Die isolierte Gesamt-RNA wurde in einem denaturierenden Agarose-Elektrophorese-Gel (Formaldehyd Agarose-Gel) der Größe nach aufgetrennt und so die Qualität der RNA bestimmt. Bei intakter RNA sollten im Gel deutlich zwei getrennte Banden zu sehen sein, die den ribosomalen RNAs 28S und 18S entsprechen (Abschnitt 4.8, Abbildung 21).

Denaturierendes Agarose-Elektrophorese-Gel: Jeweils 0,5 μg der Gesamt-RNA wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit RNA-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel zum Auftrennen von doppelsträngigen RNA-Bereichen für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Die RNA-Proben wurden auf ein denaturierendes 1% Agarosegel aufgetragen und für 40 min bei 80 V mit 1 x MOPS-Puffer als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel wurde die RNA angefärbt und konnte anschließend durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

RNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Formamid
	6,0 % (v/v) Formaldehyd (37%)
	6,0 % (v/v) Glycerin (100%)
	10 % (v/v) 10 x MOPS
	0,04 % (w/v) Bromphenolblau

Denaturierendes Agarose-Gel	1 % (w/v) Agarose
	6,0 % (v/v) Formaldehyd
	10 % (v/v) 10 x MOPS

10 x MOPS-Puffer	200 mM Morpholinopropansulfonsäure
	50 mM Natriumacetat
	5 mM EDTA
	pH 7,0 mit NaOH einstellen

3.2.2.3 cDNA-Synthese

Je 500 ng aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in eine komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) für die quantitative RT-PCR-Analyse revers transkribiert. Hierzu wurde ein Mastermix vorbereitet:

Mastermix für cDNA-Synthese	9 µl 5x Puffer
	1 µl 25 mM dNTP
	2 µl 0,1M DTT
	1 µl 40 U/µl RNasin
	0,5 µl Acrylamid 15µg/ml
	0,5 µl Hexanukleotide
	1 µl Superscript oder ddH ₂ O

Zur Kontrolle einer Amplifizierung der cDNA wurde anstelle des Enzyms *Superscript* RNase-freies Wasser verwendet (RT-Kontrolle). Der 15 µl Mastermix wurde mit 30 µl RNA-Proben (500 ng in ddH₂O) vermischt und für 1h bei 42°C im Thermomixer inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde als Vorlage in einer anschließenden quantitativen RT-PCR-Analyse verwendet, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren

3.2.2.4 Quantitative RT-PCR

Prinzip: Die quantitative RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der RT-PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen (z.B. SYBR[®] Green I). Diese Fluoreszenzfarbstoffe binden an die amplifizierte doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Maßgebend für die genaue Quantifizierung ist der sogenannte CT-Wert (*cycle threshold*), die Zykluszahl, in dem sich die gemessene Fluoreszenz deutlich von dem Hintergrund-Signal unterscheidet und einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Für jede Probe wird der CT-Wert errechnet. Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen, wobei meistens ein Referenz-Gen (z.B. *Housekeeping*-Gene GAPDH, 18S rRNA) mit gemessen wird, um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen und verschiedene Proben untereinander vergleichen zu können (relative Quantifizierung).

Bei der in der vorliegenden Arbeit überwiegend verwendeten *Taq Man* RT-PCR erfolgte die Fluoreszenz-Markierung im Rahmen der RT-PCR mit Hilfe spezifischer Primer, die mit Reporterfarbstoff und *Quencher* (Löschsubstanzen) konjugiert sind. Solange der Reporterfarbstoff mit dem *Quencher* verbunden ist, wird die Fluoreszenz blockiert. Durch die Spaltung des Konjugats durch Taq-DNA-Polymerase während der RT-PCR wird der Reporter-Farbstoff freigesetzt und es entsteht eine entsprechende Fluoreszenz.

Protokoll: Die cDNA-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 in TE-Puffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA verdünnt. Die quantitative RT-PCR wurde mit einem TaqMan[®] ABI prism 7700 (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde der TaqMan universal PCR-Mastermix verwendet, der PCR-Puffer, dNTPs und AmpliTaqGold[®] enthielt. Der jeweilige Primermix (Tabelle 4) bestand aus einem *forward* Primer und einem *reverse* Primer in einer Endkonzentration von 300 nM, sowie eventuell einer Sonde in einer Endkonzentration von 100 nM.

Je 10 µl Mastermix, 2 µl verdünnte cDNA-Proben, 7 µl H₂O und 1 µl des Primermix wurden in die Wells einer 96-Well-Microtiterplatte pipettiert.

Die Platte wurde anschließend verklebt, bei 280 g zentrifugiert und einer TaqMan-Analyse unter folgenden Temperatureinstellungen in TaqMan® RT-PCR unterzogen: Die erste Inkubation erfolgte für 2 Minuten bei 50°C, gefolgt von einer entsprechenden Aktivität der Taq-Polymerase von 10 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden die Proben während 40 Zyklen, die jeweils 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C umfassten, vervielfältigt. Die CT-Werte wurden durch Einsatz der *ABI PRISM Sequence Detection software Version 1.0* aufgezeichnet und die Ergebnisse im Verhältnis zum *Housekeeper*-Gen entsprechend berechnet.

Tabelle 4: Oligonukleide (Primers) zur mRNA-Genexpressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR.

Die weiteren vorgefertigten Oligonukleotid-Primer für Fxyd2 (NM_007503), Tnfr1 (NM_011609), Tnfr2 (NM_011610), Ccl2/Mcp-1 (NM_011333), Ccl3/Mip-1 (NM_011337), Ccl5/Rantes (NM_013653), Icam-1 (NM_010493), E-selectin (NM_011693) und 18S rRNA RT-PCR wurden kommerziell (Applied Biosystems) erworben.

Name/GenBank	Sequenz
GAPDH (NM_008084)	<i>Forward primer</i> 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3' <i>Reverse primer</i> 5'-ATGCCTGCTTCACCACCTTCT-3' VIC 5'-CCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
Nephrin (NM_019459)	<i>Forward primer</i> 5'-ACCCTCCAGTTAACTTGTCTTTGG-3' <i>Reverse primer</i> 5'-ATGCAGCGGAGCCTTTGA-3' FAM 5'-TCCAGCCTCTCTCC-3'
Vcam-1 (NM_011693)	<i>Forward primer</i> 5'-AACCCAAACAGAGGCAGAGTGTAC-3' <i>Reverse primer</i> 5'-GACCCAGATGGTGGTTTCCTT-3' FAM 5'-TGTCAACGTTGCCCC-3'
P-Selektin (NM_011347)	<i>Forward primer</i> 5'-ATGAACCCTGTTTTAAACGAAAGC-3' <i>Reverse primer</i> 5'-CTTGGTTGCTGCAGGACATG-3' FAM 5'-ACACAGCCTCCTGCC-3'
SYBR Green	
18S rRNA	<i>Forward primer</i> 5'-GCAATTATTCCCATGAACG-3' <i>Reverse primer</i> 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'
Rab6b	<i>Forward primer</i> 5'-GGTTGCCTGGTAGGTGTTGT-3' <i>Reverse primer</i> 5'-GCTGCGAAAATTCAAGTTGG-3'
FAM: Internal fluorescence labelled probe; VIC: Internal fluorescence labelled probe	

3.2.3 Microarrays

Prinzip: *Microarrays* werden zur Untersuchung der differentiellen Genexpression verschiedener Proben verwendet. Diese Technologie ist vor allem in Situationen angebracht, in denen noch nicht genau bekannt ist, welche Gene für die untersuchte klinische Fragestellung von Bedeutung sind. Sie dient in diesem Fall also als *screening*-Methode. Die *Mikroarray*-Technologie ermöglicht es die mRNA-Expression mehrerer tausend Gene gleichzeitig zu untersuchen [109]. Als Sonden zur Analyse der Genexpression dienen hierbei gebundene cDNA oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die an definierte Positionen eines Rasters zum Beispiel auf einem Glaträger (*Gen-Chip*) aufgebracht werden. Im ersten Schritt wird RNA aus dem zu untersuchenden Objekt (z.B. Gewebe) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese markierte cDNA wird dann mit dem *Microarray* hybridisiert und kann an ihren komplementären Gegenpart auf dem *Array* binden. Nach Entfernen der nicht gebundenen cDNA wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des *Microarrays* mit Hilfe eines Lasers ausgelesen.

Protokoll: Um Tnfr-abhängige inflammatorische Effekte in Glomeruli *ex vivo* zu charakterisieren, wurde eine cDNA-*Microarray*-Expressionsanalyse an TNF-stimulierten Wildtyp und Tnfr-defizienten Glomeruli *in vitro* durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 25.000 hochreine Glomeruli (entspricht 2 µg Gesamt-RNA) aus acht Wochen alten C57Bl/6J Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen gewonnen (Abschnitt 3.2.1.1), für 24 Stunden in serumfreiem Zellkulturmedium kultiviert und anschließend mit 50 ng/ml TNF für 12 Stunden stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert (Abschnitt 3.2.2.2), deren Qualität sowohl mittels eines Spektrometers als auch eines denaturierenden Agarose-Elektrophorese-Gels überprüft, in cDNA umgeschrieben und einer *Microarray*-Analyse unterzogen. Alle Schritte wurden dabei nach einem von der Firma Affymetrix empfohlenen Standardprotokoll durchgeführt. Jedes *Microarray*-Experiment wurde je Genotyp in drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt (12 *Gen-Chips*).

Des Weiteren wurden für jeden Versuchsansatz Glomeruli-Präparationen aus drei Mäusen gepoolt, um an gleichem Material eine Verifizierung möglicher Kandidatengenens mittels PCR vornehmen zu können.

Für die Genexpressionsanalyse wurde der *GeneChip®Mouse Genome 430 2.0 Array* der Firma Affymetrix eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Gesamt-Genomchip, auf dem sich 45.000 *Probe Sets* befinden, welche die Expressionsanalyse von 39.000 Transkripten und Spleiß-Varianten von etwa 34.000 gut charakterisierten Genen ermöglichen [110].

Die Messung aller *Microarrays* erfolgte mit Hilfe des *Affymetrix GeneChip Scanners 3007G*, die Bilddateien wurden mit der Software GCOS 1.0 analysiert. Die Qualität von jedem *Microarray*-Ansatz wurde geprüft. Die mRNA-Fragmentierung, Hybridisierung, Färbung sowie die Biochip-Analyse wurden in der *Affymetrix Core Facility* der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Reinhard Hoffmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie TU München ausgeführt. Die Auswertung der GeneChips wurde zum Teil in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Clemens Cohen, Universitätsspital Zürich durchgeführt.

3.2.3.1 Auswertung der Microarrays

Die Analyse der *Microarrays* wurde im Wesentlichen in drei Schritten durchgeführt: I. Normalisierung der Rohdaten, II. statistische Analyse und Filterung, III. Ontologische Einordnung der signifikant veränderten Gene und Literaturrecherche.

Am Anfang jeder *Microarray*-Analyse wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um zu prüfen ob grobe Verunreinigungen oder andere Mängel vorlagen. Dazu wurden *Images* der gemessenen Leuchtintensitäten kontrolliert sowie grafisch das Maß der RNA-Degradierung erfasst. Die nach *Image*-Analyse der 12 hybridisierten *Microarrays* erhaltenen 12 *Affymetrix GeneChip probe array files* (*CEL* und *CHP-files*) wurden unter Verwendung des RMA-Algorithmus (*robust multi-array analysis version 1.0 beta 2* [111] [112]) normalisiert. Die Identifikation differenziell exprimierter Gene erfolgte anschließend mit Hilfe der SAM (*significance analysis of microarrays, Microsoft Excel plugin of SAM, version 1.21*) nach Anleitung [113].

Dieses Programm berechnet anstelle eines p-Wertes eine „*False discovery rate*“ (FDR) als Maß für statistische Signifikanz. Die FDR beschreibt den Anteil falsch positiver Gene unter allen differenziell exprimierten Genen.

Als Maß für differenzielle Expressionen wurden Differenzen der Expressionsmittelwerte (*Fold changes*) zwischen den untersuchten Gruppen aufgezeichnet. Dabei wurden folgende Gruppen miteinander verglichen: Wildtyp- versus Tnfr1-/-, Wildtyp- versus Tnfr2-/- und schließlich Wildtyp- versus Tnfr1,2-/- Glomeruli.

Als signifikant wurden alle Gene mit einem Expressionsunterschied (*Fold change*) von $\geq 1,5$ und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Visualisierung der Mikroarraydaten erfolgte mit dem Programm *Genesis 1.0* [114] und wurde in Form einer „*Heatmap*“ dargestellt. Unter einer „*Heatmap*“ versteht man die zweidimensionale grafische Darstellung von Daten, bei denen gleichartige Werte (*Fold changes*) durch gleiche Farben dargestellt werden. In den *Microarray*-Experimenten konnten somit jeweils im Vergleich zu TNF-Stimulierten Wildtyp-Glomeruli die differentiell exprimierten Gene in Tnfr1-/-, Tnfr2-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli erfasst werden. Dies erlaubte die umfassende Charakterisierung Tnfr-abhängig exprimierten Gene in TNF-stimulierten Glomeruli.

3.2.3.2 Einteilung Tnfr1-abhängig regulierter Gene in funktionelle Gruppen

Zur weiteren Analyse der in den *Microarray*-Experimenten identifizierten Tnfr1-abhängig exprimierten Gene wurde zunächst die Zugehörigkeit der relevanten Gene zu funktionellen Gengruppen untersucht. Dies ist die Voraussetzung für die biologische Interpretation der Tnfr1-vermittelten Effekte im Glomerulus. Von Manoli et al. [115] wurde die bessere Vergleichbarkeit von Datensätzen bei Verwendung von Gengruppen statt Einzelgenuntersuchungen bestätigt. Vorab stellt sich die Frage, welche Gengruppen betrachtet und wie sie definiert werden können. Hierbei greift man auf vorgegebene Gruppen zurück, die das aktuelle biologische Wissen über Zusammenhänge zwischen Genen repräsentieren. Gengruppen sind unter anderem in den *Gene Ontology* (GO) und *KEGG* Datenbanken erfasst (Abschnitt 3.2.3.3).

Gene Ontology beschreibt für verschiedenste Organismen bekannte Funktionen und Zugehörigkeiten von Genen oder Genprodukten. Die Zuordnung (Annotation) von Genen zu *Gene Ontology*-Kategorien wird ständig weiterentwickelt, um konsistente Beschreibungen und Bezeichnungen zu gewährleisten. *Gene Ontology* stellt ein geregeltes Vokabular von biologischen Begriffen (Terms) dar und ist in die drei Kategorien molekulare Funktion (*GOTERM_MF_ALL*), zelluläre Komponente (*GOTERM_CC_ALL*) und biologischer Prozess (*GOTERM_BP_ALL*) zur Beschreibung der Genfunktionen unterteilt. Dabei sind zelluläre Komponenten Substrukturen innerhalb der Zelle wie zum Beispiel Proteinkomplexe. Eine molekulare Funktion beschreibt Aktivitäten auf molekularer Ebene wie Stoffwechselvorgänge oder Bindung und Transport von Molekülen. Ein biologischer Prozess ist eine Reihe von Ereignissen, die durch das Zusammenspiel mehrerer molekularer Funktionen hervorgerufen werden. Dabei muss man einen biologischen Prozess von einem *Pathway* unterscheiden, da für einen *Pathway* auch Interaktionen und Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Komponenten genau beschrieben sein müssen. Jeder Term ist durch eine Identifikationsnummer und einen Namen, zum Beispiel „GO:0008009“: *Chemokine activity*, eindeutig gekennzeichnet. Jedem GO-Term ist eine Gruppe von Genen zugeordnet.

Um die potenziellen Funktionen und die Zugehörigkeit der als Tnfr1 differenziell reguliert identifizierten Gene zu funktionellen Gengruppen näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Software DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, sixth version, 2003-2008* [116]) angewendet. Hierzu wurden Gene mit gleicher Funktion zu funktionellen Gruppen (*Gene Ontology*, (GO)-Kategorien) zusammengefasst [117]. Hierbei greift DAVID auf die Datenbank *Gene Ontology* zurück. GO-Kategorien mit einem *Expression Analysis Systematic Explorer Score (EASE)* von $p \leq 0.05$, *fold enrichment* ≥ 1.5 und mindestens vier enthaltenen Genen wurden als signifikant reguliert betrachtet.

3.2.3.3 Zuordnung der Tnfr1-abhängig regulierten Gene zu KEGG-Signalwegen

Eine weitere Möglichkeit für die Auswertung der Genlisten aus *Microarray*-Versuchen bietet die sogenannte *Pathway*-Analyse, bei der ganze Stoffwechselwege betrachtet werden. Die „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“ (KEGG) stellt eine umfangreiche, öffentlich zugängliche Datenbanksammlung zu signalwegrelevanten Informationen dar [118]. Sie integriert das gesamte Wissen in Bezug auf die molekularen Interaktionsnetzwerke biologischer Prozesse (*PATHWAY* Datenbank), das Wissen über den Bereich der Gene und Proteine (*GENES/SSDB/KO* Datenbanken) und der chemischen Verbindungen und Reaktionen (*COMPOUND/REACTION* Datenbanken) [118]. Die Daten aus den einzelnen Datenbanken werden als Graphen repräsentiert. Sie enthalten Bausteine (Knoten/*Nodes*), die durch Linien (*Edges*) miteinander verbunden sind. Die Linien stellen die Beziehungen zwischen den Bausteinen dar. In KEGG existieren drei grundlegende Typen von Graphen: *Gene universe*, *Protein network* und *Chemical universe*. In dieser Arbeit wurden *Protein network*-Graphen in Form von *Pathway*-Diagrammen untersucht. KEGG-Signalwege mit einem *EASE score* (*Expression Analysis Systematic Explorer*) von $p \leq 0.05$, *fold enrichment* ≥ 1.5 und mindestens vier Genen pro Gruppe wurden als signifikant betrachtet.

Die Signalwegdiagramme, die in dieser Arbeit dargestellt wurden, enthalten als Objekte Gene, Genprodukte wie Proteine und RNA und andere Moleküle, die Verknüpfungen zu weiteren Signalwegdiagrammen herstellen. Die Beziehungen zwischen diesen Objekten wurden als Pfeile dargestellt. Dabei wurden folgende Interaktionen durch Kombination aufeinander folgender Objekte und Richtungspfeilen unterschieden: Protein-Protein-Interaktionen, Gen-Expressions- und Enzym-Enzym-Beziehungen. Abbildung 10 fasst dies für das Verständnis der später dargestellten sechs Signaldiagramme zusammen.

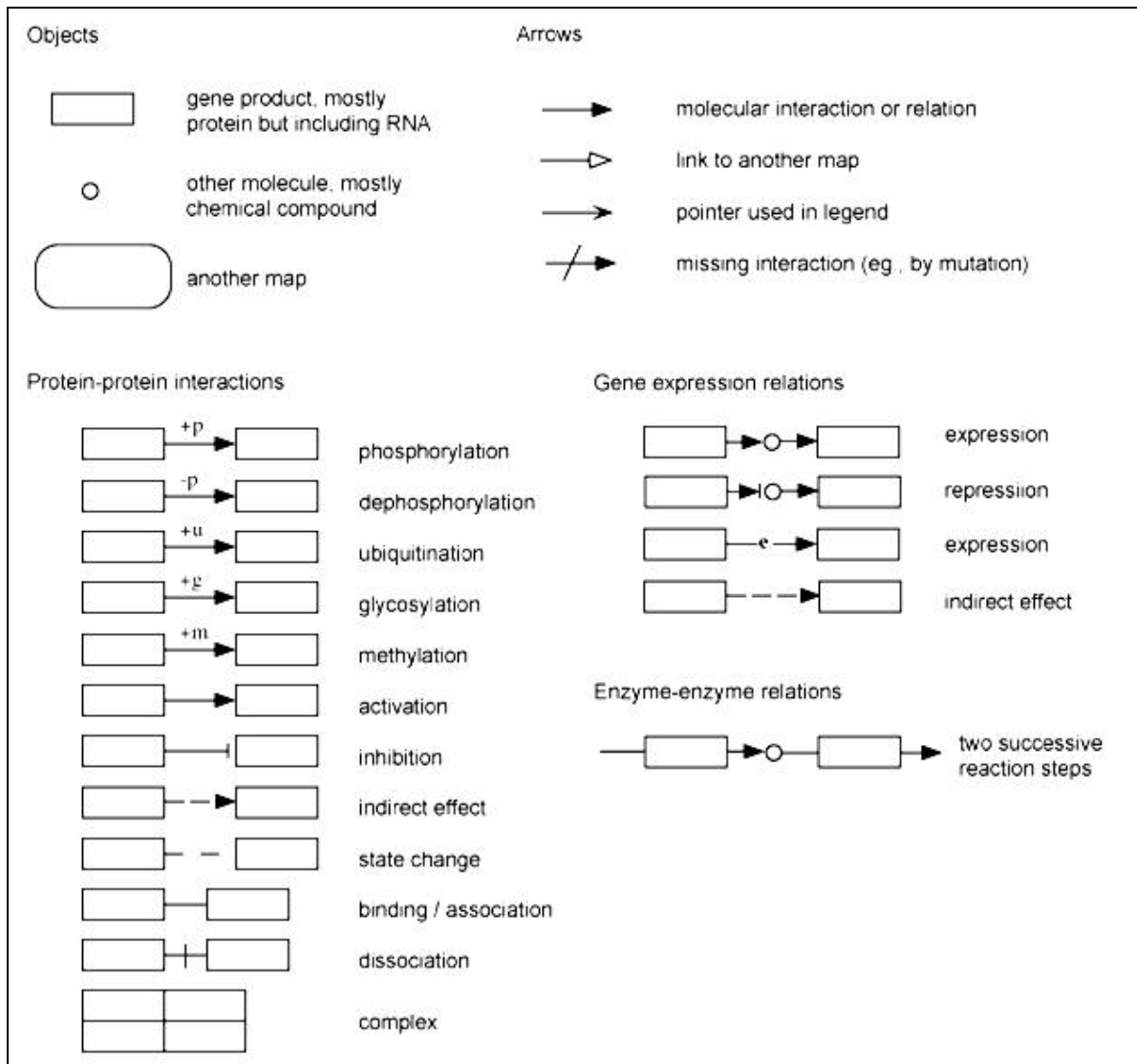


Abbildung 10: Gestaltung der KEGG-Signalwegdiagramme [116].

3.2.4 Immunhistologische Untersuchungen

3.2.4.1 Immunhistologischer Nachweis von TNF-Rezeptoren in der Mausniere

Immunhistologischer Nachweis von TNF-Rezeptoren (Tnfr1 und Tnfr2) in der Mausniere wurde an Kryostatschnitten durchgeführt.

Immunhistologische Färbungen wurden mittels der indirekten Zweischnitt-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode bindet zuerst ein unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Danach folgt die Substrat-Chromogen-Reaktion mit 3,3' Diaminobenzidine (DAB) als Chromogen. Das Protokoll für die immunhistologische Peroxidase-basierende Diaminobenzidin-Färbung wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt (DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Lab., USA).

Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen und des Avidin/Biotin, die sonst mit der Färbemethode interferieren und somit die Auswertung stören können, erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid (DAKO, Hamburg), beziehungsweise eine 15-minütige Inkubation mit einem handelsüblichen Avidin/Biotin-Blockade-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Peroxidase positive Substrate färben sich mit DAB braun an.

APES-Lösung	5 ml APES
	in 245 ml Aceton

Antikörper
<i>Anti-mouse sTNFR I Antibody</i> (0,1 mg/ml) R&D Systems, Wiesbaden
<i>Anti-mouse sTNFR II Antibody</i> (0,1 mg/ml) R&D Systems, Wiesbaden

3.2.5 Immunologische Untersuchungen

3.2.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Unterschiedliche Zellpopulationen können anhand der selektiven Expression bestimmter Oberflächenmoleküle im FACS (*fluorescence activated cell sorting*) charakterisiert werden. Hierzu wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene, wie CD-Antigene (*cluster of differentiation*) überprüft. Diese Oberflächenstrukturen sind in unterschiedlichem Maße und unterschiedlicher Zusammensetzung auf verschiedenen Zelltypen exprimiert.

In dieser Arbeit wurden sowohl Bestimmungen von Oberflächenmarkern auf Nierenzellen als auch auf Milzzellen näher charakterisiert, indem spezifische Fluorochromgekoppelte Antikörper für bestimmte Oberflächenmoleküle eingesetzt wurden. So wurden hierfür folgende Fluorochrome eingesetzt: *Fluoresceinisothiocyanat* (FITC), *R-Phycoerythrin* (PE), *PE-Cyanin 5* (PE-Cy5) und *Allophycocyanin* (APC). Zur FACS-Analyse wurde das FACSCalibur (Becton Dickinson®) und die FACS-Software Cellquest® verwendet.

3.2.5.1.1 Oberflächenexpression von TNF-Rezeptoren auf glomerulären Zelllinien

Die im Brutschrank kultivierten Zellen wurden für 10 min mit 1,5 mM EDTA/PBS-Lösung vom Boden der Kulturschale gelöst und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in kaltem PBS resuspendiert. Nach Zählung in einer Neubauer-Zählkammer wurde pro FACS-Röhrchen eine Gesamtzellzahl von 1×10^5 Zellen pro 100 μ l eingestellt.

Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 400 g zentrifugiert und das Zellpellet mit FACS-Puffer resuspendiert.

FACS-Puffer	500 ml 1x PBS
	0,2% BSA
	0,1% Na-Azid

Indirekte Färbung von Tnfr1: Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen (12 x 75 mm Rundboden-Polystyrolröhrchen) gefärbt, die anschließend direkt für die Messung eingesetzt werden konnten. Für jede Gruppe und jedes Experiment wurden Isotyp-Kontrollen mitgeführt. In ein neues beschriftetes FACS-Röhrchen wurde ein Mix aus 5 µl Rattenserum (Kat.Nr. 012-000-120, Jackson Immuno Research, Konzentration 50 mg/ml) und 5 µl Mausserum (Kat.Nr. 015-000-120, Jackson Immuno Research, Konzentration 50 mg/ml) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen pipettiert. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl Zellsuspension zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Der primäre Antikörper (*Purified Hamster anti-Mouse Tnfr1 mAk*, BD™ Pharmingen, Kat.Nr. 559915, Konzentration 0,5 mg/ml) wurde dann in einer Verdünnung von 1:75 dazu pipettiert und für 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem FACS-Puffer durch zentrifugieren für 2 min bei 4°C und 600 g gewaschen und der Überstand bis auf 100 µl abgesaugt. Der Zellsuspension wurde wiederholt ein Mix aus 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum zugegeben und für 10 min inkubiert. Es folgte eine Zugabe vom Sekundärantikörper (*Biotin-conjugated mouse anti-armenian and syrian hamster IgG cocktail mAk*, BD™ Pharmingen Kat.Nr. 554010, Konzentration 0,5 mg/ml), der ebenfalls in einer Verdünnung von 1:75 eingesetzt wurde und für 60 min bei 4°C inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und der Überstand bis auf 100 µl abgesaugt. Es folgte eine Zugabe von je 1,4 µl PE-konjugierten Streptavidin (*RPE-conjugated streptavidin*, Dako, Kat.Nr R0438, Konzentration 0,3 g/l) zu dem jeweiligen Ansatz und eine erneute Inkubation für 60 min bei 4°C. Nach erneutem, zweimaligem Waschen der Zellen wurde der Überstand bis auf 300 µl abgesaugt und bis zur zeitnahen FACS-Analyse bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Direkte Färbung von Tnfr2: In FACS-Röhrchen wurde zunächst, wie bei der Tnfr1-Färbung, ein Mix aus 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum vorgelegt, gefolgt von einer Zugabe von 100 µl Zellsuspension und einer Inkubation für 10 min bei 4°C. Anschließend wurde der Primärantikörper (*PE-Hamster anti-Mouse Tnfr2 mAk*, BD™ Pharmingen, Kat.Nr 550086, Konzentration 0,2 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:75 dazugegeben und für 60 min bei 4°C und lichtgeschützt inkubiert.

Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und der Überstand bis auf 300 µl abgesaugt und ebenfalls bis zur zeitnahen FACS-Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.5.1.2 Bestimmungen von Oberflächenmarkern auf Nierenzellen

Um die immunologischen Vorgänge wie die renale Leukozyteninfiltration bei 24 Wochen alten Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen mittels FACS-Analyse untersuchen zu können, wurde eine Einzelzellsuspension aus dem Nierengewebe der Mäuse gewonnen. Dazu wurden die Nierenschnitte in einer Petrischale auf Eis mit 3 ml Paris-Puffer mit einem Skalpell in etwa 0,5 mm große Stücke zerkleinert. Die Nierensuspension wurde zweimal mit 10 ml HBSS-Lösung (mit Ca, Mg) gewaschen, das Pellet mit 5 ml vorgewärmter Kollagenase/DNase-Lösung resuspendiert und für 20 min im 37°C Wasserbad verdaut. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff wurde die Suspension in 2 mM EDTA/HBSS-Lösung (ohne Ca, Mg) für 20 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Daraufhin erfolgte ein erneuter Verdau des verbliebenen Pellets mit Kollagenase-Lösung. Um aus den verdauten Nierenstücken eine Einzelzellsuspension für die FACS-Analyse zu erhalten, wurde die Nierensuspension erst durch eine 19G-Kanüle, gefolgt von einer 26G- und schließlich einer 30G-Kanüle ausgespritzt. Nach weiteren Waschschriffen des Pellets mit eisgekühltem PBS wurde die Zellsuspension bei 250 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert. Durchschnittlich konnten $1-3 \times 10^6$ Zellen aus einer Mausniere gewonnen werden. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert.

Durch Zugabe eines Mix aus 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum wurden unspezifische Bindungsstellen an der Zelloberfläche blockiert und schließlich die Oberflächenmarker mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt. Dabei wurde pro Ansatz jeweils eine 4-fache Färbung mit CD45-PE, CD3-FITC, CD4-APC und CD8-PE-Cy5 sowie eine 3-fache Färbung mit CD45-PE, F4/80-APC und CD11c-FITC durchgeführt.

Paris-Puffer	20 mM Tris-HCl
	125 mM NaCl
	10 mM KCl
	10 mM Na-Azetat
	5 mM D-Glukose
	ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCl)

10x HBSS mit Ca und Mg	4 g KCl
	0,6 g KH ₂ PO ₄
	80 g NaCl
	0,62 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	3,5 g NaHCO ₃
	1,4 g CaCl ₂
	1 g MgCl ₂
	1 g MgSO ₄ x 7H ₂ O
	10 g D-Glukose
	ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCl)

10x HBSS ohne Ca und Mg	4 g KCl
	0,6 g KH ₂ PO ₄
	80 g NaCl
	0,62 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	ad 1000 ml ddH ₂ O, autoklavieren

Kollagenase/DNase-Lösung in 1x HBSS ohne Ca, Mg	10 mg Kollagenase (Typ I)
	1 ml 1 mg/ml DNase (Typ III)
	Stammlösung
	9 ml 1x HBSS ohne Ca, Mg
	10 ml

2 mM EDTA/HBSS-Lösung	100 µl 0,2 EDTA- Stammlösung
	10 ml 1x HBSS ohne Ca, Mg
	10 ml

Kollagenase-Lösung in 1x HBSS ohne Ca, Mg	10 mg Kollagenase (Typ I)
	10 ml 1x HBSS mit Ca, Mg
	10 ml

FACS-Antikörper für die Nierzellen	
CD45-PE	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD3-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD4-APC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-PE-Cy5	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
F4/80-APC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD11c-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg

3.2.5.1.3 Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Milzzellen

Die aus Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen isolierten Splenozyten (Abschnitt 3.2.1.10) wurden ebenfalls mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurde zusätzlich eine durchflußzytometrische Bestimmung der Milzzellzahl durchgeführt. Hierfür wurden *CALTAG Counting Beads* (PCB-100, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Bestimmung von Oberflächenmarker auf isolierten Milzzellen wurde pro Ansatz jeweils eine 4-fache Färbung mit B220-PE, CD3-FITC, CD4-APC und CD8-PE-Cy5, eine 2-fach Färbung mit CD25-Cy5 und CD4-APC sowie eine 2-fach Färbung mit CD11c-PE und CD40-FITC durchgeführt.

FACS-Antikörper für die Milzzellen	
B220-PE	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD3-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD4-APC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD8-PE-Cy5	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD11c-PE	BD/Becton Dickinson, Heidelberg
CD40-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg

3.2.5.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Prinzip: Unter *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* versteht man ein auf einer enzymatischen Farbreaktion beruhendes immunologisches Nachweisverfahren. Hierbei werden Antikörper, die spezifisch an ihr Antigen (die nachzuweisende Substanz) binden, (eingesetzt. Antigene werden dabei an einen festen Träger sog. ELISA-Platte) gebunden und anschließend mit einem Enzym-gekoppelten-Detektionsantikörper inkubiert. Durch mehrere Waschschrte werden freie, nicht gebundene Antikörper entfernt. Eine durch das Enzym katalysierte Farbreaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Ein spezielles Substrat wird dabei vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann. Durch Auftragen der nachzuweisenden Substanz in verschiedenen exakt definierten Konzentrationen kann eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die gemessene Absorption der Probe in eine Konzentration umgerechnet werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung von Proteinen in den Überständen von stimulierten Glomeruli (Abschnitt 3.2.1.6) mit ELISA nach der Sandwich-Methode durchgeführt. Alle Messungen der Farbreaktionen erfolgten mittels *ELISA-Reader*, welcher die Absorption proportional zur gebundenen Proteinmenge misst.

3.2.5.2.1 Ccl2/Mcp-1-, Ccl5/Rantes- und Cxcl10/Ip-10-Konzentrationsbestimmung

In den Überständen von stimulierten Glomeruli (12h, 50 ng/ml TNF) wurden folgende Chemokine mittels ELISA-Kits nachgewiesen: Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes und Cxcl10/Ip-10. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

ELISA-Kits	
Maus Ccl2/Mcp-1	R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt
Maus Ccl5/Rantes	R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt
Maus Cxcl10/Ip-10	R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt

3.2.5.2.2 Bestimmung der Albuminurie

Die Konzentration des Albumins im Urin der Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen wurde mittels ELISA-Kits nach Herstellerangaben bestimmt. Hierfür wurde eine Urin-Verdünnungsreihe von 10^2 - 10^7 angesetzt und in dreifacher Ausführung bestimmt.

ELISA-Kit Albumin	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

3.2.6 Kreatininbestimmung

Da das Ausmaß der Albuminurie in spontanen Urinproben bestimmt wurde, erfolgt die Normalisierung der Albuminkonzentrationen durch Urinkreatininwerte. Kreatinin entsteht im Muskelstoffwechsel irreversibel aus Kreatinphosphat und wird durch die Niere überwiegend glomerulär ausgeschieden. Die Bestimmung des Kreatinins im Urin von Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse wurde nach der sogenannten Jaffé-Methode durchgeführt. Dieser Methode liegt die chemische Eigenschaft von Kreatinin zugrunde in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol) einen orangefarbenen Farbkomplex zu bilden, dessen Extinktionsdifferenz proportional zur Kreatinkonzentration ist. Zu Beginn der bei Raumtemperatur durchgeführten Bestimmung wurde in einer Küvette 1 µl Urin mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt und anschließend durch Zugabe von Natronlauge (0,16 mol/l) alkalisiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa einer Minute wurden 250 µl Pikrinsäure (4,0 mmol/l) zugegeben. Anschließend wurde die Extinktion sowohl nach 1 min als auch nach 3 min im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Neben den eigentlichen Urinproben wurden jeweils auch ein Leerwert sowie ein Standardwert mit der Kreatinkonzentration von 2 mg/dl gemessen. Zur Berechnung der Kreatinkonzentration wurde die Differenz der bei 1 min und 3 min gemessenen Extinktion berechnet. Die Extinktionsdifferenz eines Leerwertes wurde anschließend von der Extinktionsdifferenz der Probe und des Standardwerts subtrahiert. Die Kreatinkonzentration stellte nun den mit der Kreatinkonzentration des Standards und der Verdünnung der Probe multiplizierten Quotienten aus den Extinktionsdifferenzen der Probe und des Standardwertes dar.

$$C_{\text{(Kreatinin)}} \text{ (mg/dl)} = \frac{(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}}{(E_2 - E_1)_{\text{Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}} \times C_{\text{(Kreatinin - Standard)}} \times 50$$

3.2.7 Tierversuche

3.2.7.1 Versuchstierhaltung

Jeweils fünf Mäuse wurden in Makrolone-Typ II-Käfigen bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Alle verwendeten Mäusestämme wurden vom Jackson Laboratorium, Bar Harbor, ME, USA einmalig erworben und in der zentralen Versuchstierhaltung, unter SPF-Bedingungen (*SPF, specific pathogen-free*) des Klinikums Innenstadt der Universität München weiter vermehrt oder gekreuzt. Sie wurden dort regelmäßigen mikrobiologischen Kontrolluntersuchungen unterzogen. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Organentnahmen am toten Tier wurden der Regierung von Oberbayern gemeldet.

3.2.7.2 Versuchstiere

B6.129S2-*Tnfrsf1a*^{tm1Mak}

Dieser Knockout-Mausstamm trägt eine induzierte Mutation, eine Neomycinkassette in Position 535 der codierten Sequenz des *Tnfr1-* (*Tnfrsf1a-*) Gens auf Chromosom 6. Die Mutanten entwickeln sich normal, zeigen jedoch eine abgeschwächte mikrobielle Resistenz [119]. Dabei fehlt jegliche Ausbildung von Peyer'schen Platten in der Darmmukosa. Die Ausbildung von Lymphknoten ist hingegen vorhanden. Mäuse, die für die *Tnfrsf1a* *tm1Mak*-Mutation homozygot sind, haben eine normale Thymozytenentwicklung, Lymphozytenpopulationen und eine klonale Deletion der selbstreaktiven T-Zellen. TNF-Signaling ist größtenteils abgeschafft, ohne TNF-Induktion der NF-κB.

Homozygote Mäuse sind resistent gegen lebensgefährliche Dosen von entweder Lipopolysacchariden oder von *S. aureus* Enterotoxin, aber sie erliegen einer *L. monocytogenes* Infektion. Eine „*radioligand binding assay*“ Methode zeigte, dass kein funktionelles Tnfr1-Protein auf der Zelloberfläche von Splenozyten exprimiert wurde, die aus homozygoten Knockout-Mäusen gewonnen wurden [119].

B6.129S2-Tnfrsf1b^{tm1Mak}

Dieser Mausstamm trägt das eingesetzte Konstrukt, eine Neomycinkassette, in dem zweiten Exon des Tnfr2- (*Tnfrsf1b*-) Gens, das die Signalpeptidregion kodiert. Um zu bestätigen, dass das Gen ausgeschaltet wurde, wurden Knockout-Mäuse mit Lipopolysacchariden stimuliert, die das *Shedding* der extrazellulären Domäne von Tnfr2 verursachen. Es konnte kein lösliches Tnfr2 im Serum der Knockout-Mäuse nachgewiesen werden. Homozygote Mäuse sind entwicklungsfähig und fruchtbar. Sie zeigen normale T-Zellentwicklung und -Aktivität und sind weniger anfällig gegen TNF induzierten Zelltod. Subkutane Gabe von TNF in homozygoten Mäusen führt bei diesen zur verminderten Gewebenekrosen [119].

Tnfr1,2-/- Maus

Dieser Mausstamm wurde durch die Kreuzung der beiden Tnfr-Knockout-Mausstämme B6.129S2-Tnfrsf1a^{tm1Mak} und B6.129S2-Tnfrsf1b^{tm1Mak} erzeugt.

MRL/MPJ Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr-Maus)

(vergleiche Abschnitt 2.3.4).

3.2.7.3 Rückkreuzung der Tnfr-defizienten Mäuse in den MRL/lpr-Hintergrund

Zur Untersuchung der Rolle der beiden TNF-Rezeptoren bei Lupusnephritis wurde in dieser Arbeit eine Rückkreuzung der Tnfr-defizienten C57BL/6J-Mäuse in MRL/lpr-Mäuse bis zur N6-Generation durchgeführt (Abbildung 11). Diese Rückkreuzung war erforderlich, da die *lpr*-Mutation nur in dem genetischen Hintergrund des MRL/lpr-Mausstammes, nicht jedoch in C57BL/6J-Hintergrund zu einer klinisch und histopathologisch ausreichend manifesten Lupusnephritis führt. Im ersten Schritt wurden die sechs Wochen alten MRL/lpr- und C57BL/6J-Mäuse miteinander verpaart (Abbildung 11). Ihre selektionierten heterozygoten Tnfr-defizienten Nachkommen (N1-Generation) wurden nochmals mit MRL/lpr-Mäusen verpaart. Dabei nähert sich der gesamte genetische Hintergrund der Tnfr-defizienten Mäuse mit jeder neuen rückgekreuzten Generation zunehmend dem des Zielstammes (MRL/lpr) an, während die heterozygote Rezeptordefizienz erhalten bleibt. Die Nachkommen der N2-Generation wurden erneut mit MRL/lpr-Mäusen verpaart und dieser Rückkreuzungsprozess wurde dementsprechend bis zur N6-Generation fortgesetzt. In der N6-Generation wurden die heterozygoten Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse untereinander gekreuzt, um die homozygote Defizienz für den jeweiligen Rezeptor zu erreichen. In der N6-Generation befanden sich die Mäuse bereits zu >99% im MRL/lpr-Hintergrund.

Durch Verpaarung der heterozygoten Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse der N6-Generation und entsprechender Selektion wurden neben den homozygoten Tnfr1- und Tnfr2-defizienten MRL/lpr-Mäusen parallel homozygote Tnfr-exprimierende MRL/lpr-Kontrollmäuse generiert. Anschließend wurde der Krankheitsverlauf (Phänotypanalyse) in den so generierten Mäusen untersucht. Dabei wurden ausschließlich weibliche Mäuse untersucht.

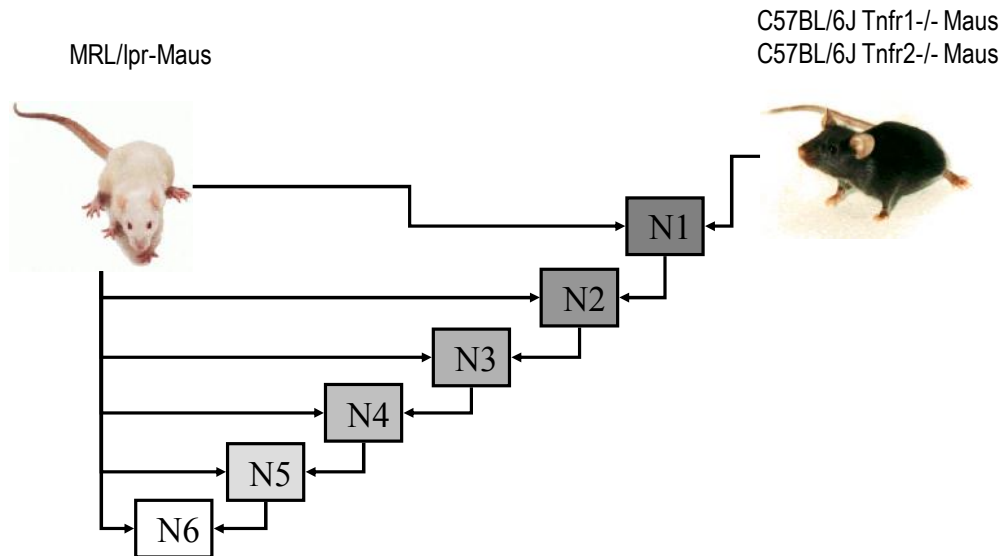


Abbildung 11: Rückkreuzung der Tnfr-defizienten C57BL/6J-Mäuse.

Die Tnfr-defizienten C57BL/6J-Mäuse wurden in den MRL/lpr-Hintergrund rückgekreuzt. Dabei wurden drei Mausstämme Tnfr-exprimierende MRL/lpr-Kontrollmäuse, Tnfr1-/- MRL/lpr-Mäuse und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäuse generiert.

3.2.7.4 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien von mindestens vier Wochen alten Tieren verwendet. Dabei wurde jeweils 2-5 mm der Schwanzspitze in 200 µl PBND-Puffer mit 1 µl Proteinase K (Konzentration 20 mg/ml) mindestens vier Stunden bei 56°C in einem Schüttel-Thermoblock inkubiert und verdaut. Verbliebene feste Bestandteile wurden für 5 Minuten bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand (genomische DNA) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1 µl genomischer DNA mit 24 µl eines PCR-Mix (Tabelle 5) gemischt und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die eindeutige Bestimmung des Genotyps wichtige Gene amplifiziert. Hierzu wurden genspezifische Primer (Tabelle 6) ausgewählt und verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in Geräten der Firma Biometra durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und der Genotyp der Mäuse anhand des Bandenmusters bestimmt.

PBND-Puffer	2 M KCl
	1 M TRIS-HCl (pH 8,3)
	1 M MgCl ₂
	0,1 % w/v gelatin bzw. 1 ml 1 % w/v gelatin
	100 % NP40
	100 % Tween 20
	dd H ₂ O

Tabelle 5: PCR-Mix

Reaktion-Mix:	Für die Reaktion: 25 µl
dd H ₂ O	14,0 µl
10 x Puffer	2,5 µl
dNTP	4,0 µl (300 µM)
Primer (jeweils)	1,0 µl (10 pM/µl)
Taq Polymerase	0,5 µl
DNA	1,5 µl

Tabelle 6: Primer für die PCR

Name/Firma/Primer Nr.	Sequenz
Tnfr1wtp (Invitrogen, H7590H06)	5'-TGTGAAAAGGGCACCTTTACGGC-3'
Tnfr1cop (Invitrogen, H7590H07)	5'-GGCTGCAGTCCACGCACTGG -3'
Tnfr1nup (Invitrogen, H7590H08)	5'-ATTCGCCAATGACAAGACGCTGG-3'
Tnfr2aap (Invitrogen, H7590H09)	5'- CCTCTCATGCTGTCCCGGAAT-3'
Tnfr2plp (Invitrogen, H7590H010)	5'-AGCTCCAGGCACAAGGGCGGG -3'
Tnfr2vvp (Invitrogen, H7590H011)	5'- CGGTTCTTTTTGTCA AGAC-3'
Tnfr2nbp (Invitrogen, H7590H06)	5'- ATCTCTGCCGTCGGGCATGC-3'
Fasrev (Invitrogen, H7590H03)	5'-GGTGCAGCCAGAAGCTAG -3'
Fasfor (Invitrogen, H7590H04)	5'-AAAGGTTACAAAAGGTCACCC -3'
Lprrev (Invitrogen, H7590H05)	5'-GTTCTCTTAGCATCTCTCTGC -3'

Thermocyclerprotokoll	Tnfr1-/-	
	94°C, 3 min	
	94°C, 20 sec	12x
	64°C, 30 sec	
	72°C, 35 sec	
	94°C, 20 sec	25x
	58°C, 30 sec	
	72°C, 35 sec	
	72°C, 2 min	
Tnfr2-/-		MRL/lpr
94°C, 3 min		94°C, 3 min
94°C, 1 min	35x	94°C, 1,5 min
55°C, 1 min		57°C, 1,2 min
72°C, 2 min		72°C, 2,3 min
72°C, 2 min		72°C, 7 min

Nichtdenaturierende Agarosegel-Elektrophorese: Die vervielfältigte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,5% Elektrophoresegel hergestellt, indem 1,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst wurde und anschließend 10 µl Ethidiumbromid (Konzentration von 10 mg/ml) zugegeben wurde. Die DNA-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 6x DNA-Probenpuffer (6x *Gel Loading Solution*) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 100 bp- beziehungsweise 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) mit auf das Agarosegel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 Volt für 45 Minuten durchgeführt und das Gel abschließend unter UV-Licht fotografiert.

Zeigte sich eine einzelne Bande bei 470 bp, so handelte es sich um Wildtyp Tnfr1-Mäuse, zeigte sich dagegen eine einzelne Bande bei 300 bp, so handelte es sich um eine homozygote Tnfr1-Knockout-Maus. Bei Tnfr2 wies eine Bande bei 200 bp auf Wildtyp-Tnfr2-Mäuse hin und eine Bande bei 400 bp auf eine homozygote Tnfr2-Knockout-Maus. Zeigte sich eine Bande bei 512 bp, so handelte es sich um Wildtyp MRL-Mäuse und eine Bande bei 318 bp wies auf homozygote MRL/lpr-Mäuse auf.

TBE-Puffer	89 mM TRIS
	89 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	in ddH ₂ O lösen und mittels HCl auf pH 8,0 einstellen

DNA-Probenpuffer	10 mM Tris/HCL
	20 % (v/v) Glycerin
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	pH 7,5

3.2.7.5 Narkotisieren der Mäuse

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer Anästhesie-Lösung (Tabelle 7) narkotisiert. Die Dauer bis zum Eintreten der notwendigen Narkosetiefe wurde durch einen abgeschwächten Muskeltonus und fehlenden Schmerzreize erkennbar und betrug etwa 15 min.

Tabelle 7: Anästhesie- und Antagonisten-Lösung für die Blutentnahme bei Mäusen.

Anästhesie-Lösung	10,0 ml Midazolam (1 mg/ml)
	2,0 ml Fentanyl (0,05 mg/ml)
	1,0 ml Dormitor (1 mg/ml)
Antagonisten-Lösung	5,0 ml Anexate (0,1 mg/ml)
	0,5 ml Antisedan (5 mg/ml)
	3,0 ml Naloxon (0,4 mg/ml)

3.2.7.6 Urin-, Blut- und Gewebeentnahme

In den drei generierten Mausstämmen Wildtyp, Tnfr1^{-/-} und Tnfr2^{-/-} MRL/lpr der N6-Generation wurde der spontane Krankheitsverlauf (Lupusnephritis) im Alter von 24 Wochen untersucht. In der 24. Lebenswoche erfolgte eine Urinentnahme, danach wurden die Tiere zur Blut- und Organentnahme sowie Gewichtsbestimmung von Nieren, Milz und Lymphknoten getötet. Die Blutentnahme erfolgte aus dem retroorbitalen Venenplexus. Dabei wurde eine heparinisierte Blutkapillare (Durchmesser 0,8 mm, K&K Laborbedarf, München) unter leichtem Drehen in das Venengeflecht des lateralen Augenwinkels gelegt, bis das Blut in der Kapillare aufstieg und aufgefangen wurde. Etwa 300 µl Blut konnten auf diese Weise gewonnen werden. Nach Gerinnung des Vollbluts wurde das Serum durch Herunterzentrifugieren (5 min, 14 000 U/min, Biofuge 15, Firma Heraeus) des Blutes gewonnen, das Serum wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert. Die Analyse der Serumparameter erfolgte durch synlab.vet GmbH & Co. KG Labor Augsburg. Vor der Nieren- und Milzentnahme wurden diese am toten Tier mit PBS über die linke Herzkammer bis zur gänzlichen Blutleere perfundiert. Anschließend wurden die Nieren herauspräpariert, die Nierenkapseln entfernt und das Gewebe für weitere Analysen verwendet. Teile der Niere wurden für die RNA-Isolation, für die Nierenzellisolation und anschließende FACS-Analyse (Abschnitt 3.2.5.1.2) sowie für die spätere Herstellung von Kryostatschnitten isoliert. Des Weiteren wurde Nierengewebe für die histologische Aufbereitung in 10% Formalin über Nacht fixiert. Zudem wurde die Milz sowohl zur Gewinnung von Splenozyten als auch für die histologische Aufbereitung herauspräpariert.

3.2.8 Statistische Auswertung

Zu den gesammelten Daten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Eine Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert $<0,05$ angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden unter Verwendung des doppelseitigen, nicht parametrischen *Mann-Whitney-U-Tests* verglichen. Wenn mehr als zwei experimentelle Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde ein *Kruskal-Wallis-Test* gefolgt von einem, *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Anhand von Kaplan-Meier-Analysen wurde eine Überlebenskurve erstellt. Die Berechnungen wurden mit *GraphPad Prism 5.0* durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Paramagnetische Glomeruli-Isolation aus Mausnieren

Um die Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in Maus-Glomeruli zu erforschen, war es von großer Bedeutung alle Untersuchungen an möglichst reinen Glomeruli durchzuführen, ohne jegliche Verunreinigung durch anderes Nierengewebe, wie zum Beispiel durch Tubulointerstitium. Hierfür wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die paramagnetische Glomeruli-Isolation modifiziert nach Takamoto et al [106] verwendet.

Dieses Isolationsverfahren durchläuft mehrere Waschschrte, um möglichst reine Glomeruli zu isolieren (Abschnitt 3.2.1.1). Als Nebenprodukte wurden auch Tubulointerstitium und Tubuli gewonnen und in dieser Arbeit partiell mituntersucht. Abbildung 12 zeigt die aus einer acht Wochen alten C57BL/6J-Maus gewonnenen kompartimentspezifischen Fraktionen: Glomeruli, Tubuli und das Tubulointerstitium.

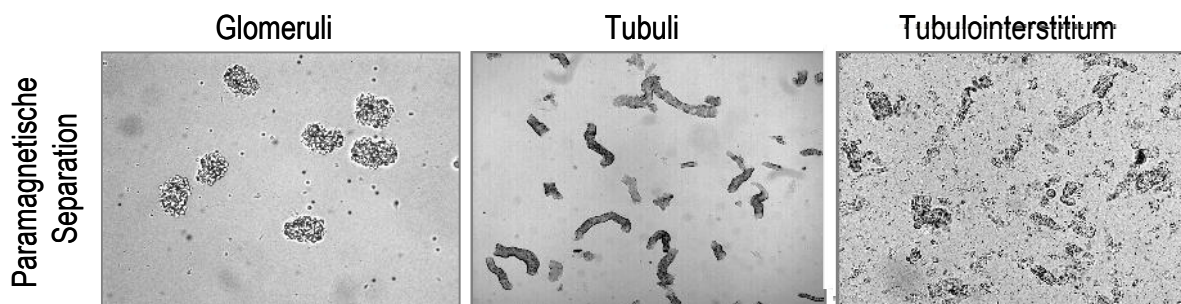


Abbildung 12: Gewonnene Nierenfraktionen aus einer C57BL/6J-Maus mit Hilfe der paramagnetischen Glomeruli-Isolation:

Dargestellt sind die gewonnenen Fraktionen: Glomeruli, Tubuli und Tubulointerstitium. Die Glomeruli werden ohne Bowman-Kapsel isoliert. Hellfeldaufnahmen mit 63 x Objektiv.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten Fraktionen wurde die Expression spezifischer Marker mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR gemessen. Als spezifische Marker für Glomeruli wurde *Nephrin*, für Tubuli/Tubulointerstitium *Fxyd2* verwendet [120]. *Nephrin* ist ein Protein, das wesentlich am Aufbau der Podozyten-Schlitzmembran [121] und an der Signalübertragung im Bereich des Glomerulus [122] beteiligt ist.

Das *Fxyd2*-Gen kodiert für die γ -Untereinheit der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, welche an der basolateralen Zellmembran im distalen Tubulus lokalisiert ist [120]. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert.

Nach der paramagnetischen Isolation konnte eine *Nephrin*-mRNA-Expression nur in Glomeruli und nicht in Tubulointerstitium nachgewiesen werden (Abbildung 13, C). Im Gegensatz dazu wurde die *Fxyd2*-mRNA-Expression präferentiell in Tubulointerstitium und nur gering in Glomeruli nachgewiesen (Abbildung 13, D).

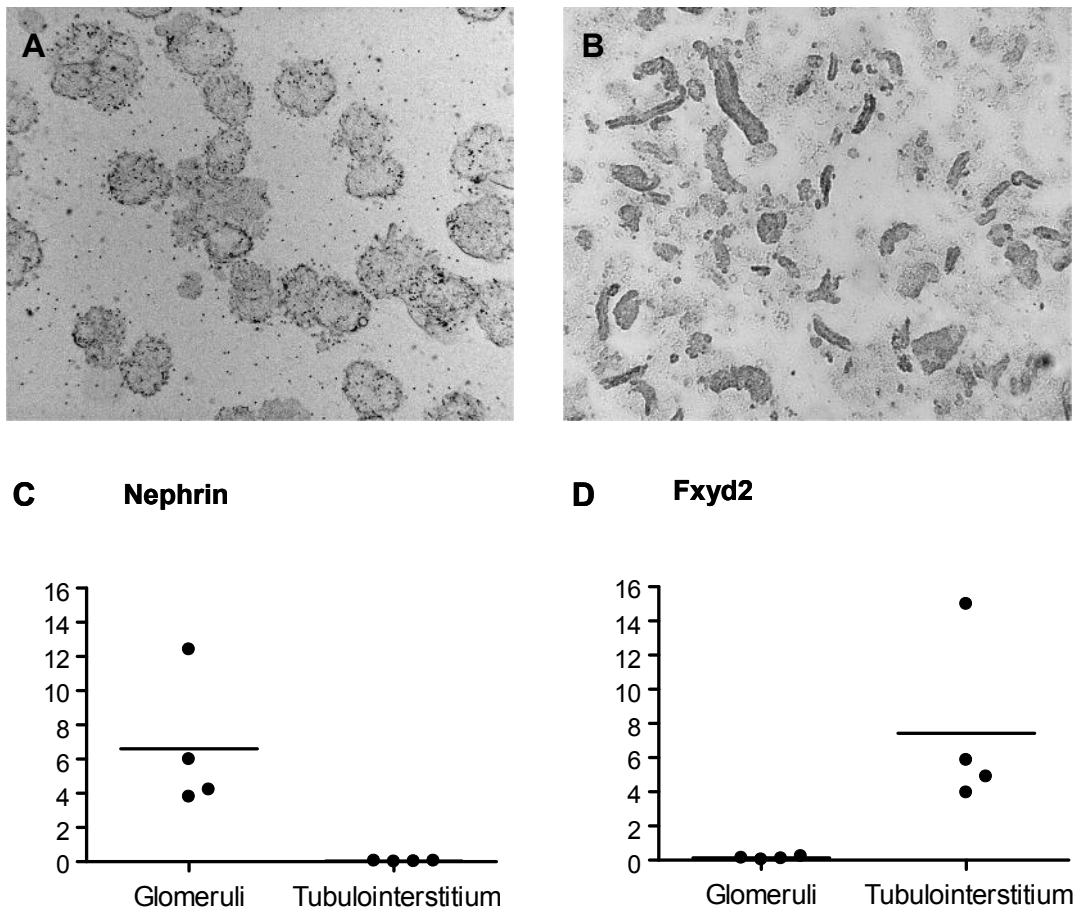


Abbildung 13: Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten Nierenfraktionen.

Gesamt-RNA wurde aus zwei Nierenfraktionen, Glomeruli (A) und Tubulointerstitium (B), von acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen (n=4) extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR für den Nachweis zweier Gewebe-spezifischer Marker unterzogen. Dabei wurde als glomerulärer Marker *Nephrin* (C) und als tubulärer Marker *Fxyd2* (D) gewählt. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). * $p < 0,05$ versus unstimuliertes Tubulointerstitium.

4.2 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in gesunder Mausniere

In den folgenden Experimenten wurde die glomeruläre und tubulointerstitielle Tnfr-Expression sowohl auf transkriptioneller als auch auf Protein-Ebene in gesunden Mausnieren untersucht. Für die Analyse der mRNA-Expression wurden Glomeruli und Tubulointerstitium aus unbehandelten, acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen isoliert und anhand daraus gewonnener cDNA das mRNA-Expressionsprofil von Tnfr1 und Tnfr2 untersucht (Abbildung 14, A-B).

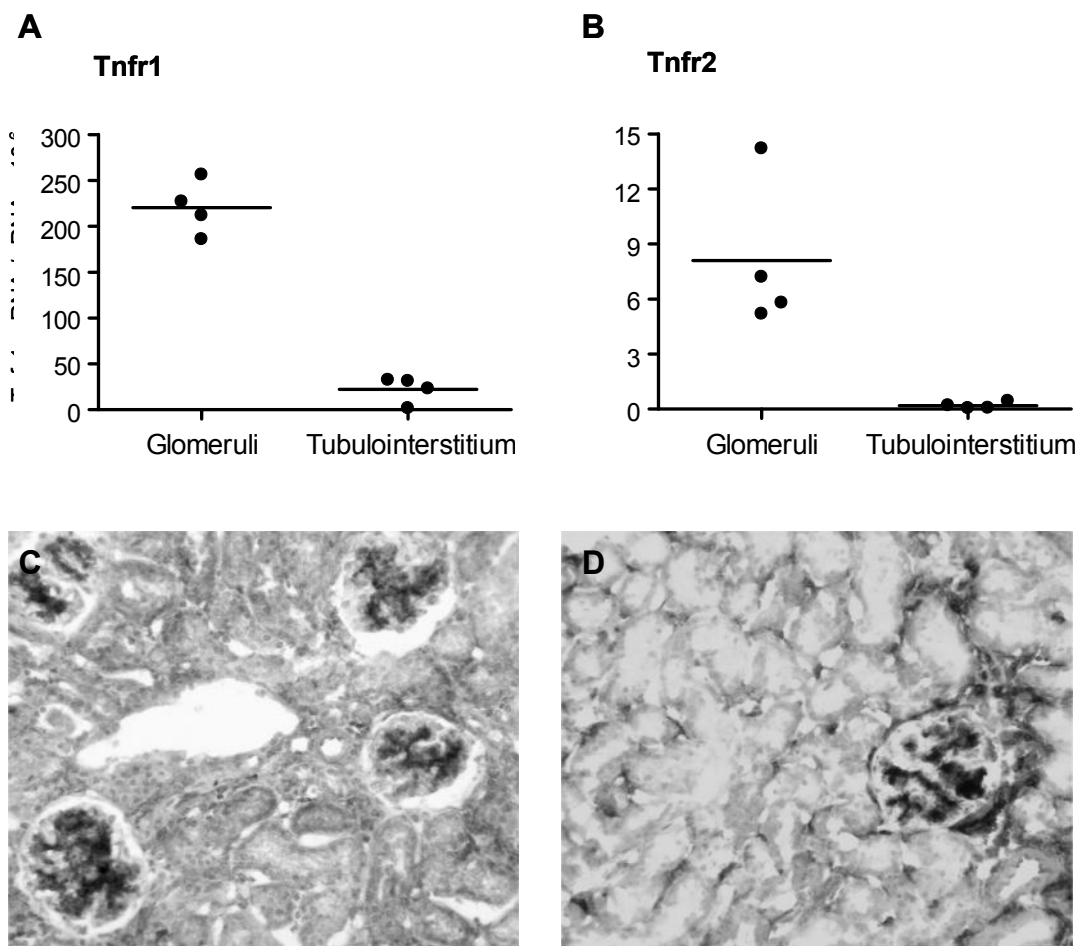


Abbildung 14: Kompartimentspezifische Tnfr1- und Tnfr2-Expression in Mausnieren.

Die quantitativen RT-PCR-Ergebnisse (A-B) stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Versuchen (n=4) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^6 multipliziert. Der immunohistochemische Nachweis der Tnfr-Expression (C-D) erfolgte am selben Nierengewebe. Dabei wurden die Gewebeschnitte mit polyklonalen *goat anti-mouse Tnfr1* und polyklonalen *goat anti-mouse Tnfr2* Antikörpern behandelt. * $p < 0,05$ versus unstimuliertes Tubulointerstitium.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression beider Rezeptoren mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse im Nierengewebe derselben Mäusen analysiert (Abbildung 14, C-D). Beide TNF-Rezeptoren wurden präferentiell in Glomeruli und nur gering in Tubulointerstitium exprimiert (Abbildung 14, A-B). Ferner wurde eine etwa 30-fach höhere glomeruläre Tnfr1-mRNA-Expression im Vergleich zur Tnfr2-mRNA-Expression beobachtet. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte die immunhistochemische Analyse der Mausniere eine ausgeprägte Tnfr1- und Tnfr2-Proteinexpression in Glomeruli und nur eine schwache Rezeptor-Expression in Tubulointerstitium (Abbildung 14, C-D).

4.3 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in intrinsischen glomerulären Zelllinien

Ergänzend zur mRNA-Expressionsuntersuchung beider Rezeptoren im intakten unstimulierten Glomeruli wurde die Tnfr1- und Tnfr2-mRNA-Expression sowohl in unstimulierten als auch zytokinstimulierten glomerulären Endothel- (Abbildung 15, A-B) und Mesangial-Zellen (Abbildung 15, C-D) *in vitro* analysiert.

Während eine TNF-Stimulation (25 ng/ml, 5 h) von Endothelzellen zur Induktion von Tnfr2-mRNA-, nicht jedoch Tnfr1-mRNA-Expression führte, induzierte eine IFN- γ -Stimulation (200 U/ml, 5h) in gleichen Zellen die Expression von beiden Rezeptoren. Die gleichzeitige TNF- und IFN- γ -Stimulation der Zellen löste nur für Tnfr2, nicht jedoch Tnfr1 eine verstärkte mRNA-Expression aus. In Mesangialzellen führte weder alleinige TNF- (25 ng/ml, 24 h) noch IFN- γ -Stimulation (200 U/ml, 24h) zur einer Induktion der Tnfr1-mRNA-Expression, während die Tnfr2-Expression durch TNF oder IFN- γ induziert wurde (Abbildung 15, C-D). Im Gegensatz dazu stieg die Expression beider Rezeptoren nach kombinierte Stimulation mit beiden Zytokinen an.

Da die Ligandenbindung (TNF) an die beiden Tnf-Rezeptoren zur Abspaltung der Rezeptor-Außendomäne (*Shedding*) oder ihrer Internalisierung führen kann, wurde im folgenden Versuch die Oberflächen-Expression von Tnfr1 und Tnfr2 sowohl in unstimulierten als auch in beiden zytokinstimulierten glomerulären Zellen analysiert (Abbildung 15, E-H). In Endothelzellen sank die Tnfr1 Oberflächen-Expression nach einer TNF- und einer gleichzeitigen TNF-/IFN- γ -Behandlung signifikant ab. Ferner reduzierte sowohl TNF- als auch IFN- γ -Behandlung die Tnfr2 Oberflächen-Expression (Abbildung 15, E-F). Im Gegensatz zu Endothelzellen nahm die Tnfr1 Oberflächen-Expression in Mesangialzellen sowohl nach TNF- als auch IFN- γ -Behandlung nicht ab (Abbildung 15, G). Zudem führte eine gleichzeitige TNF- und IFN- γ -Behandlung der Zellen sogar zum Anstieg der Tnfr2 Oberflächen-Expression, nicht jedoch die alleinige TNF-Stimulation.

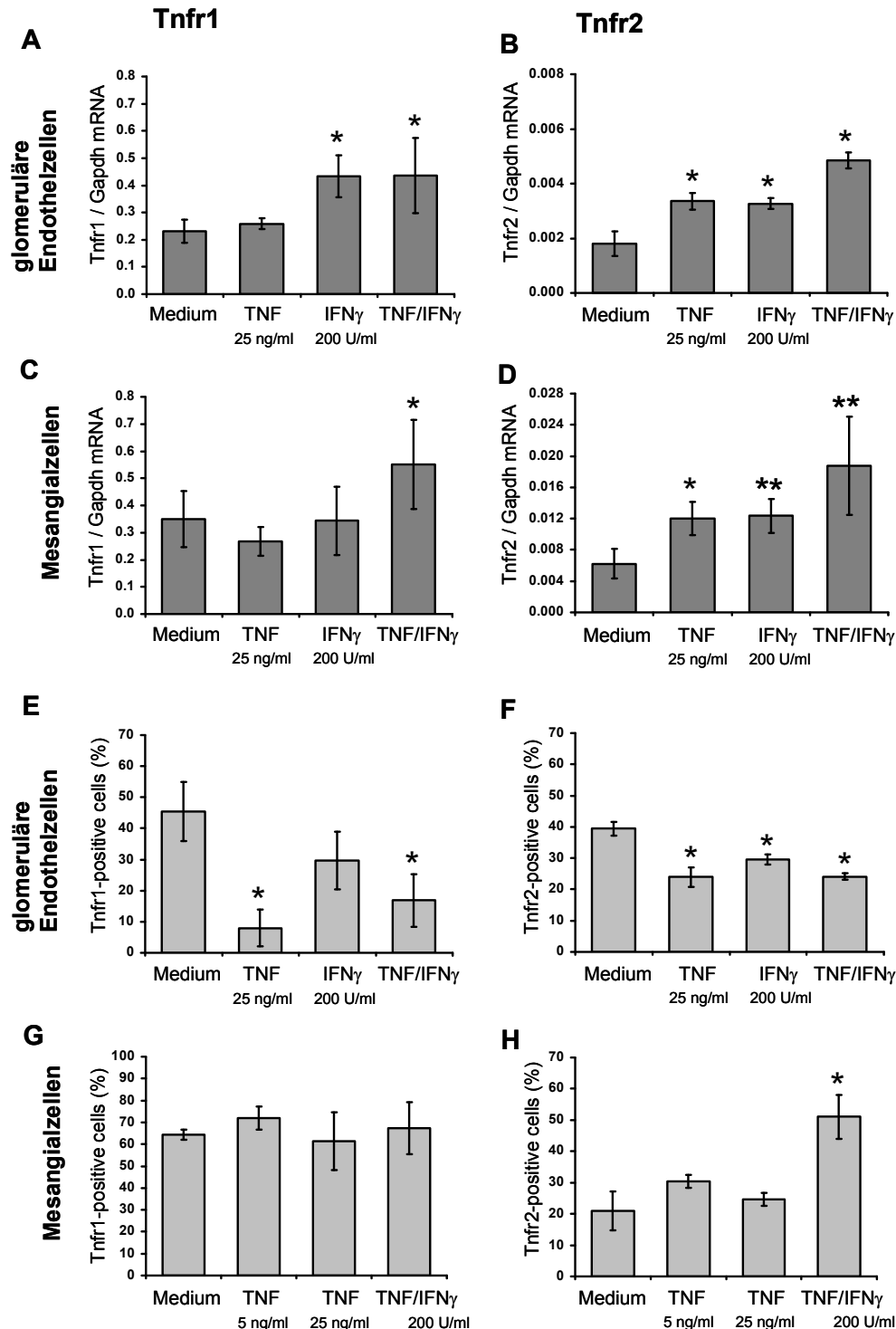


Abbildung 15: Tnfr1- und Tnfr2-Expression in intrinsischen glomerulären Zelllinien.

Die Endothel- und Mesangialzelllinien wurden *in vitro* mit TNF, IFN- γ oder einer Kombination der beiden Zytokine stimuliert. Anschließend wurde mRNA-Expression (A-D) und Oberflächen-Expression (E-H) beider Rezeptoren in jeweiliger Zelllinie mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (A-D) und FACS-Analyse (E-H) untersucht. Die Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Versuchen (n=4) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die Gapdh-mRNA-Kontrolle normalisiert. * p<0,05 unstimulierte versus stimulierte Zellen, ** p<0,001 unstimulierte versus stimulierte Zellen;

4.4 Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in gesunden Mausnieren

Die Ursachen einer Entzündung sind vielfältig. Allerdings ist allen Entzündungsreaktionen gemeinsam, dass sie mit einer Hyperämie, einer gesteigerten Kapillarpermeabilität und der Infiltration von Entzündungszellen ins Gewebe einhergehen. Dabei spielen Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Adhäsionsmoleküle und Chemokine eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung, Aktivierung und Migration von Leukozyten (Abschnitt 2.4.1). Bei zunehmender Leukozyteninfiltration werden diese schließlich selbst eine Hauptquelle der renalen Produktion von Chemokinen und Zytokinen.

Um die kompartimentspezifische mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren zu analysieren, die glomerulär oder tubulointerstitiell eine lokale Leukozyten-Rekrutierung auslösen können, wurden Adhäsionsmoleküle wie Icam-1, Vcam-1, P-Selektin und E-Selektin sowie proinflammatorische Chemokine wie Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1 α und Ccl5/Rantes in gesunden, unbehandelten Mausnieren untersucht. Dazu wurden aus acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen Glomeruli und Tubulointerstitien isoliert. Aus der daraus gewonnenen Gesamt-RNA wurde cDNA hergestellt und einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen.

Die RT-PCR-Ergebnisse zeigen in normalen Nieren eine signifikant höhere glomeruläre mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen wie Icam-1, P-Selektin und E-Selektin, aber schwache bis gar keine Expression im Tubulointerstitium (Abbildung 16, A-D). Indessen war die Vcam-1-Expression in Glomeruli und im Tubulointerstitium vergleichbar (Abbildung 16, B). Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse zeigen auch eine signifikant hohe, konstitutive Expression von Ccl2/Mcp-1-, Ccl3/Mip-1 α - und Ccl5/Rantes-mRNA in den Glomeruli, wobei die Ccl5/Rantes-mRNA-Expression am stärksten war. Im Tubulointerstitium konnte dagegen nur eine geringe konstitutive Expression dieser Chemokine beobachtet werden. Zusammenfassend weist die Transkriptionsanalyse von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in gesunden Mausnieren auf eine konstitutive Expression dieser Mediatoren bevorzugt in Glomeruli hin. Vcam-1 stellt dabei eine Ausnahme dar.

Des Weiteren korrelierte die starke glomeruläre Tnfr1- und Tnfr2-mRNA-Expression mit der konstitutiven Expression der hier untersuchten Chemokine (Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1 α und Ccl5/Rantes) und Zelladhäsionsmoleküle (P-Selektin, E-Selektin, Icam-1) in gesunden unbehandelten C57BL/6J-Mausnieren.

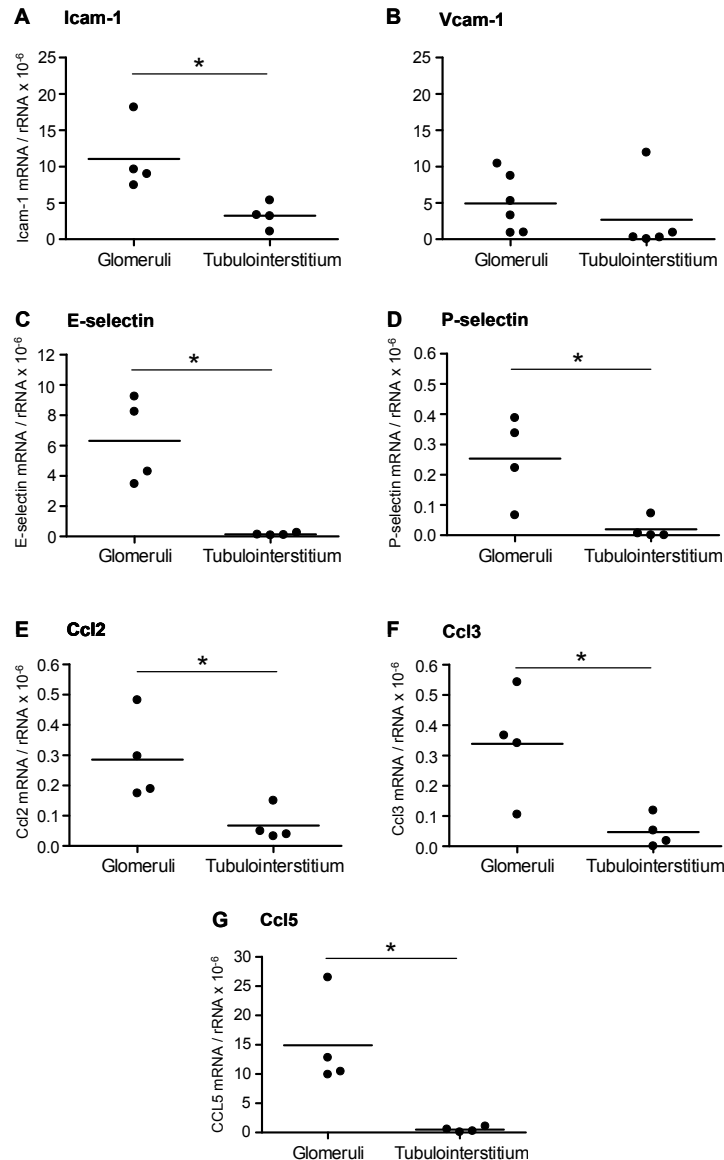


Abbildung 16: Kompartmentsspezifische mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren in gesunden Mausnieren.

Untersucht wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle Icam-1 (A), Vcam-1 (B), E-Selektin (C), P-Selektin (D) und der Chemokine Ccl2/Mcp-1 (E), Ccl3/Mip-1 α (F) und Ccl5/Rantes (G) in gesunden Mausnieren. Die mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR erhobenen Daten stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Versuchen (n=4) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^6 multipliziert. * $p < 0,05$ versus unstimuliertes Tubulointerstitium.

4.5 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 nach intraperitonealer TNF-Applikation *in vivo*

Nach den Versuchen an gesunden Mausnieren erfolgten dieselben Analysen, jedoch nach *in vivo* TNF-Exposition der C57BL/6J-Mäuse. Dabei wurde die Expression der Tnfr-mRNA in Glomeruli und Tubulointerstitium analysiert. Hierfür wurden acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen 5µg rekombinantes murines TNF intraperitoneal appliziert [123]. Nach acht Stunden wurden Glomeruli und Tubulointerstitium isoliert, aus beiden Fraktionen wurde die cDNA gewonnen und einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen. Als Vergleichskontrollen dienten hierbei Fraktionen aus unstimulierten Mäusen.

Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zeigen hinsichtlich der Tnfr1-mRNA-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen unstimulierten und TNF-stimulierten Mäusen ($p > 0,05$) in beiden untersuchten Kompartimenten, allerdings bei tendentiell verstärkter Tnfr1-Expression nach TNF-Stimulation. Das Tnfr2-mRNA-Expressionsprofil in Glomeruli wies nach einer TNF-Gabe ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, aber tendentiell gesteigerte Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Im Gegensatz dazu stieg die Tnfr2-Expression im Tubulointerstitium signifikant um das 11-fache an (Abbildung 17).

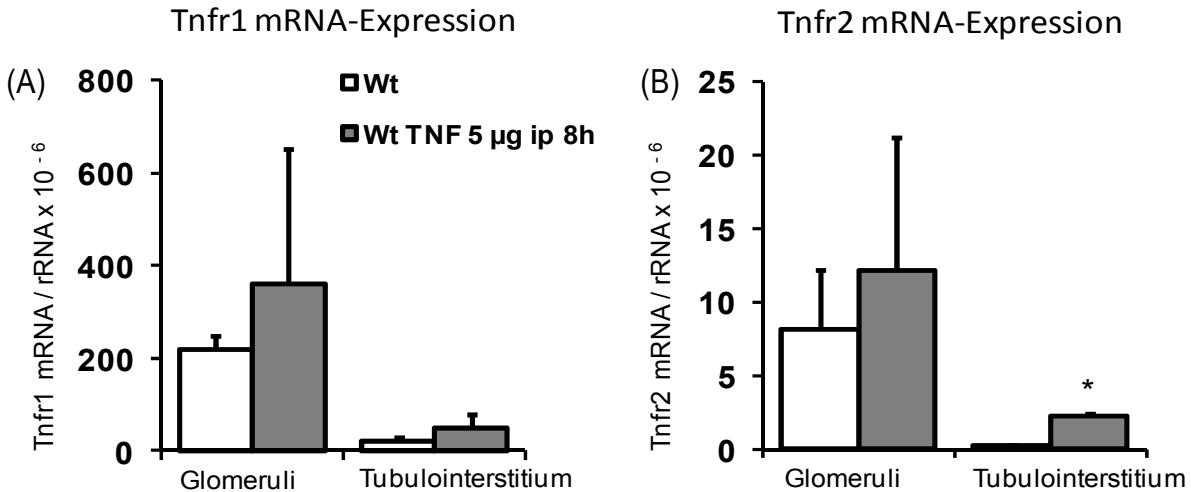


Abbildung 17: Tnfr1- und Tnfr2-mRNA-Expression nach einer TNF-Behandlung.

Acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen wurden 5µg TNF intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach 8 Stunden wurden Glomeruli und Tubulointerstitien isoliert, die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR für den Nachweis einer Tnfr1- (A) und Tnfr2-mRNA-Expression (B) unterzogen. Als Vergleichskontrollen dienten Proben aus unstimulierten Mäusen. Die dargestellten Ergebnisse stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Versuchen (n=4) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10⁶ multipliziert. *p<0,05 versus unstimuliertes Tubulointerstitium.

4.6 Expression glomerulärer Endzündungsmediatoren nach intraperitonealer TNF-Applikation

In einer Studie von Neumann et al [123] wurde schon früher gezeigt, dass *in vivo* eine intraperitoneale TNF-Gabe in Wildtyp-C57BL/6J-Mäusen eine renale Vcam-1- und E-Selektin-Expression induziert und eine Leukozyten-Infiltration stimuliert. Auf diese Befunde aufbauend wurde im folgenden Versuch die Expression der Adhäsionsmoleküle Icam-1, Vcam-1, P- und E-Selektin sowie der proinflammatorischen Chemokine Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1α und Ccl5/Rantes nach einer TNF-Behandlung der Mäuse spezifisch in Glomeruli analysiert. Hierfür wurden die in Abschnitt 4.5 isolierten und beschriebenen cDNA verwendet.

Die in Abbildung 18 dargestellten RT-PCR-Ergebnisse zeigen die Induktion der glomerulären mRNA-Expression bezogen auf Kontrolltiere von ausgewählten Adhäsionsmolekülen und Chemokinen nach intraperitonealer TNF-Applikation *in vivo*.

Die TNF-Stimulation (5µg, 8h) bewirkte eine signifikante glomeruläre Induktion der mRNA-Expression fast aller analysierten Moleküle. Ccl5/Rantes stellt dabei eine Ausnahme ohne signifikante Induktion dar.

Die genaue Analyse der durch TNF-induzierten Expressionsprofile der Adhäsionsmoleküle in Glomeruli ergab, dass die Expression von Icam-1 um das 19-fache, von Vcam-1 um das 11-fache, von P-Selektin um das 120-fache und schließlich die von E-Selektin um das 30-fache im Vergleich zu unstimulierten Glomeruli erhöht war (Abbildung 18).

An derselben Ausgangs- und Kontroll-cDNA wurde auch die Expression der Chemokine Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1α und Ccl5/Rantes untersucht. Die dargestellten Ergebnisse zeigen auch hier einen starken Anstieg der mRNA-Expression von Ccl2/Mcp-1 und Ccl3/Mip-1α nach 8 Stunden nach intraperitonealer TNF-Applikation in Glomeruli. Hierbei nahm die Expression von Ccl2/Mcp-1 um das 60-fache und von Ccl3/Mip-1α um das 17-fache zu. Für Ccl5/Rantes konnte eine tendenzielle, allerdings statistisch nicht signifikante glomeruläre Expressionszunahme beobachtet werden.

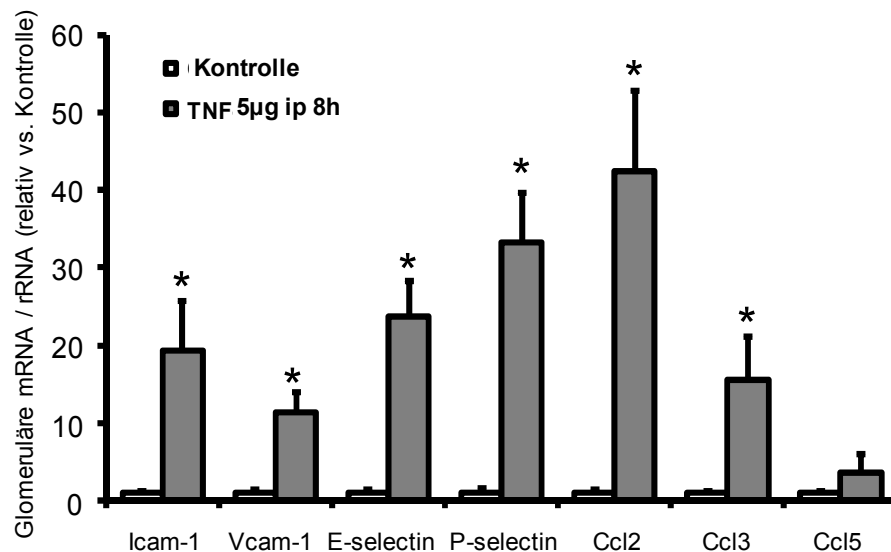


Abbildung 18: Glomeruläre Expression von Entzündungsmediatoren nach einer TNF-Exposition.

Acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen wurden 5µg TNF i.p. appliziert. Nach 8 Stunden wurden Glomeruli isoliert, daraus die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR für den Nachweis der Adhäsionsmoleküle Icam-1, Vcam-1, P- und E-Selektin und der Chemokine Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1α und Ccl5/Rantes unterzogen. Als Vergleichskontrollen dienten Proben aus unstimulierten Mäusen. Die erhobenen Daten stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von vier Versuchstieren (n=4) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA) und als Expressions-Unterschiede (*fold changes*) dargestellt. * p<0,05 versus unstimulierte Glomeruli.

4.7 Glomeruläre Leukozyten-Infiltration als Folge einer TNF-Exposition

Im Anschluss an Versuch 4.6 wurde im Folgenden untersucht, ob die TNF induzierte mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen *in vivo* zu einer Leukozyteninfiltration in Glomeruli führt. Hierfür wurde nach TNF-Gabe (5µg ip, 8h) die glomeruläre Leukozytenzahl mittels kompartimentspezifischer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten Glomeruli, die aus unstimulierten, PBS injizierten Mäusen isoliert wurden. Die Daten der kompartimentspezifische Durchflusszytometrie wurden von Herrn cand. med. Martin Schwarz im Rahmen seiner Promotionsarbeit erarbeitet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, dass TNF-Gabe zur signifikanten glomerulären Infiltration von CD45⁺ Leukozyten, Ly6C⁺ Neutrophile und F4/80⁺ mononukleäre Phagozyten führte. Im Gegensatz dazu blieb eine glomeruläre Akkumulation von CD3⁺ Zellen nach der TNF-Gabe aus.

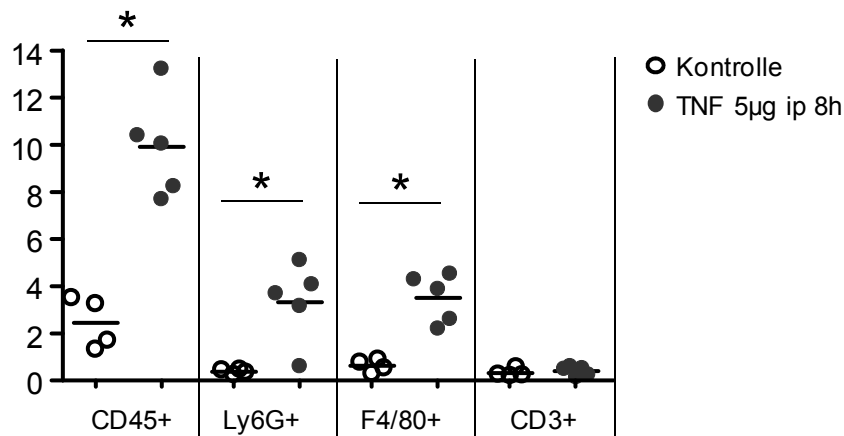


Abbildung 19: Nachweis der glomerulären Leukozyteninfiltration nach einer TNF-Behandlung.

Acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen wurden 5µg TNF i.p. appliziert. Nach 8 Stunden wurde die glomeruläre Leukozytenzahl mittels kompartimentspezifischer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Vergleichskontrollen dienten Proben aus unstimulierten Glomeruli. Die erhobenen Daten stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils vier bis fünf Versuchstieren (n=4-5) dar. * p<0,05 versus unstimulierte Glomeruli. (nach M. Schwarz, Manuskript eingereicht).

4.8 cDNA-Microarray-Analyse von Glomeruli

Vorarbeiten hatten eine entscheidende proinflammatorische Rolle von renal, nicht jedoch leukozutär exprimierten Tnfr2 im Modell der Nephrotoxischen Serumnephritis gezeigt [124]. Um Tnfr-abhängige inflammatorische Effekte in intrinsischen glomerulären Zellen unabhängig von infiltrierenden Leukozyten zu charakterisieren, wurde daher eine cDNA-*Microarray*-Expressionsanalyse an Wildtyp- und Tnfr-defizienten Glomeruli nach TNF-stimulierten *in vitro* durchgeführt. Da bei den vorangegangenen *in vivo* Versuchen nach intraperitonealer TNF-Injektion (Abschnitt 4.5 und 4.6) unbekannt war, welche TNF-Wirkspiegel in den Glomeruli die aufgezeigten inflammatorischen Effekte vermitteln, wurde zunächst ein *in vitro*-Pilotexperiment mit TNF-Stimulation in verschiedener Konzentration durchgeführt und mittels quantitativer RT-PCR ausgewertet. Dieses ermöglichte die optimale TNF-Konzentration herauszufinden, die dann zur *in vitro*-Stimulation der Glomeruli in den *Microarray*-Experimenten eingesetzt werden sollte.

In Anlehnung an die Studie von Wolf et al [125] wurden die paramagnetisch isolierten Glomeruli aus Wildtyp-Mäusen mit unterschiedlichen TNF-Konzentrationen (0,5, 5, 10, 25, 50 ng/ml TNF) 12 Stunden *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde cDNA hergestellt und die Expression ausgewählter Gene mittels RT-PCR analysiert. Als Vergleichskontrolle diente cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). In Abbildung 20 wird hierfür exemplarisch das Expressionsprofil von Ccl2/Mcp-1 dargestellt.

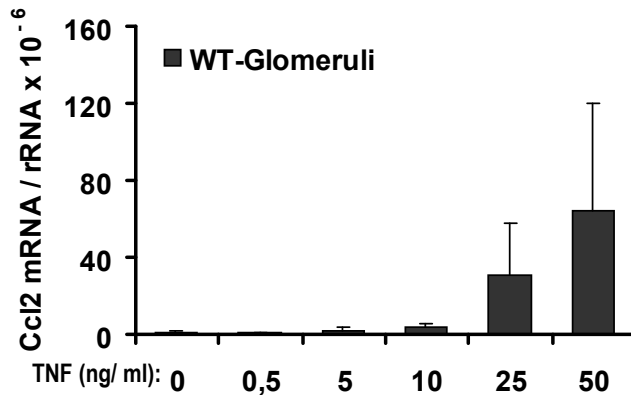


Abbildung 20: Ccl2-mRNA-Expression in Glomeruli in vitro nach einer TNF-Behandlung.

Aus acht Wochen alten C57BL/6J-Mäusen (Wildtyp) wurden Glomeruli isoliert, in Zellkultur aufgenommen und mit 0,5, 5, 10, 25 und 50 ng/ml TNF für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde cDNA gewonnen und einer quantitativen RT-PCR für den Nachweis der mRNA-Expression unterzogen. Die erhobene Daten stellen eine Zusammenfassung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Versuchen (n=3) dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^6 multipliziert.

Die 12-stündige TNF-Stimulation von Glomeruli bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Ccl2-Expression. Diese stieg im Vergleich zur Kontrolle bei TNF-Konzentrationen von 25 ng/ml und 50 ng/ml um das 28-fache beziehungsweise um das 58-fache an (Abbildung 20). Daher wurde die TNF-Konzentration von 50 ng/ml bei Inkubationsdauer von 12 Stunden für die nachfolgenden cDNA-*Microarray*-Experimente festgelegt. Hierfür wurden hochreine Glomeruli aus acht Wochen alten Wildtyp-, *Tnfr1*^{-/-}, *Tnfr2*^{-/-} und *Tnfr1,2*^{-/-} Mäusen gewonnen (Abbildung 21,①), für 24 Stunden in Serumfreiem Zellkulturmedium kultiviert und anschließend mit 50 ng/ml TNF für 12 Stunden stimuliert (Abbildung 21,②). Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, deren Qualität überprüft (Abbildung 21,③), in cDNA umgeschrieben und einer *Microarray*-Analyse (Abbildung 21,④) unterzogen.

Alle *Array*-Experimente wurden je Genotyp in drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt. Die Glomeruli-Isolate aus einer Maus ergaben etwa 2 µg Gesamt-RNA sehr guter Qualität. Für jeden Versuchsansatz wurden Glomeruli-Präparationen aus drei Mäusen gepoolt. Für die Genexpressionsanalyse wurde das *GeneChip®Mouse Genome 430 2.0 Array* der Firma *Affymetrix* eingesetzt [110]. Die statistische Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Abschnitt 3.2.8).

Als Maß für differenzielle Expressionen wurden relative Unterschiede der Expressionsmittelwerte (*fold changes*) zwischen den untersuchten Gruppen aufgezeichnet. Dabei wurden folgende Gruppen miteinander verglichen: Wildtyp- versus Tnfr1^{-/-}, Wildtyp- versus Tnfr2^{-/-} und schließlich Wildtyp- versus Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli. Je Genotyp wurden drei unabhängige *Microarray*-Untersuchungen durchgeführt. Als signifikant unterschiedlich exprimiert wurden alle Gene mit einem Expressionsunterschied (*fold change*) von $\geq 1,5$ und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt.

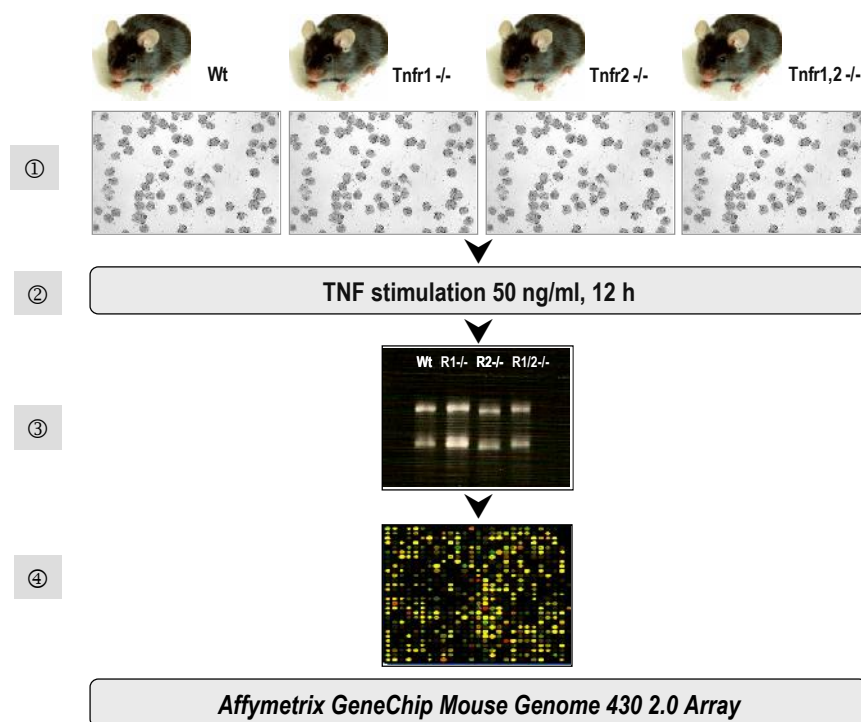


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei dem cDNA-Microarray-Experiment.

Aus acht Wochen alten Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen wurden hochreine Glomeruli gewonnen^①. Diese wurden in Zellkulturmedium inkubiert. 24 Stunden vor Stimulation wurden die Glomeruli in Serum-freiem Medium kultiviert und anschließend mit 50 ng/ml TNF für 12 Stunden stimuliert^②. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert und die RNA-Qualität mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft^③. Im Gel sind zwei deutliche, scharfe, getrennte Banden zu sehen, die den ribosomalen RNAs 28S und 18S entsprechen. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und einer *Microarray*-Analyse^④ unterzogen.

Die Expressionsmittelwerte aller in den *Microarrays* erfassten Gene aus den drei Genotyp-Vergleichen mit Wildtyp-Glomeruli sind als XY-Punktdiagramme in Abbildung 22 dargestellt. Dabei wurden die Wildtyp-Expressionswerte (y-Achse) jeweils den Expressionswerten aus Tnfr-defizienten Glomeruli (x-Achse) gegenübergestellt. Diese Darstellung ermöglicht auf einen Blick Korrelationen zwischen den erfassten Expressionswerten zu erkennen. Das Diagramm enthält Punkte (Gen-Expressionswerte), denen unterschiedliche Farben zugewiesen sind. Dabei repräsentieren graue Punkte in beiden Vergleichsgruppen vergleichbar und schwarze Punkte differenziell exprimierte Gene.

Da in Tnfr1,2-/- Glomeruli bei komplettem Fehlen aller TNF-Rezeptoren keine TNF-induzierten Expressionsveränderungen auftreten können, erfasst der Vergleich von TNF-stimulierten Wildtyp- mit Tnfr1,2-/- Glomeruli (Abbildung 22A) alle Gene, die nach TNF Exposition verändert exprimiert werden. Unter den hier angewendeten Stimulationsbedingungen wurden insgesamt 290 Gene identifiziert, von denen in TNF-stimulierten Wildtyp-Glomeruli im Vergleich zu Tnfr1,2-/- Glomeruli 219 Gene vermehrt und 71 Gene vermindert exprimiert wurden. Eine komplette Auflistung aller in Tnfr1,2-/- Glomeruli in Vergleich zu Wildtyp differenziell exprimierten Gene ist im Anhang, Tabelle A3 dargestellt.

Aus der *Microarray*-Analyse geht hervor, dass die TNF-stimulierte Gen-Expression in Glomeruli vorrangig Tnfr1-abhängig erfolgt und nur wenige Gene unter den analysierten Bedingung Tnfr2-abhängig exprimiert werden (Abbildung 22B-C). In den folgenden Abschnitten werden die Tnfr1- und Tnfr2-abhängig regulierten Gene genauer charakterisiert.

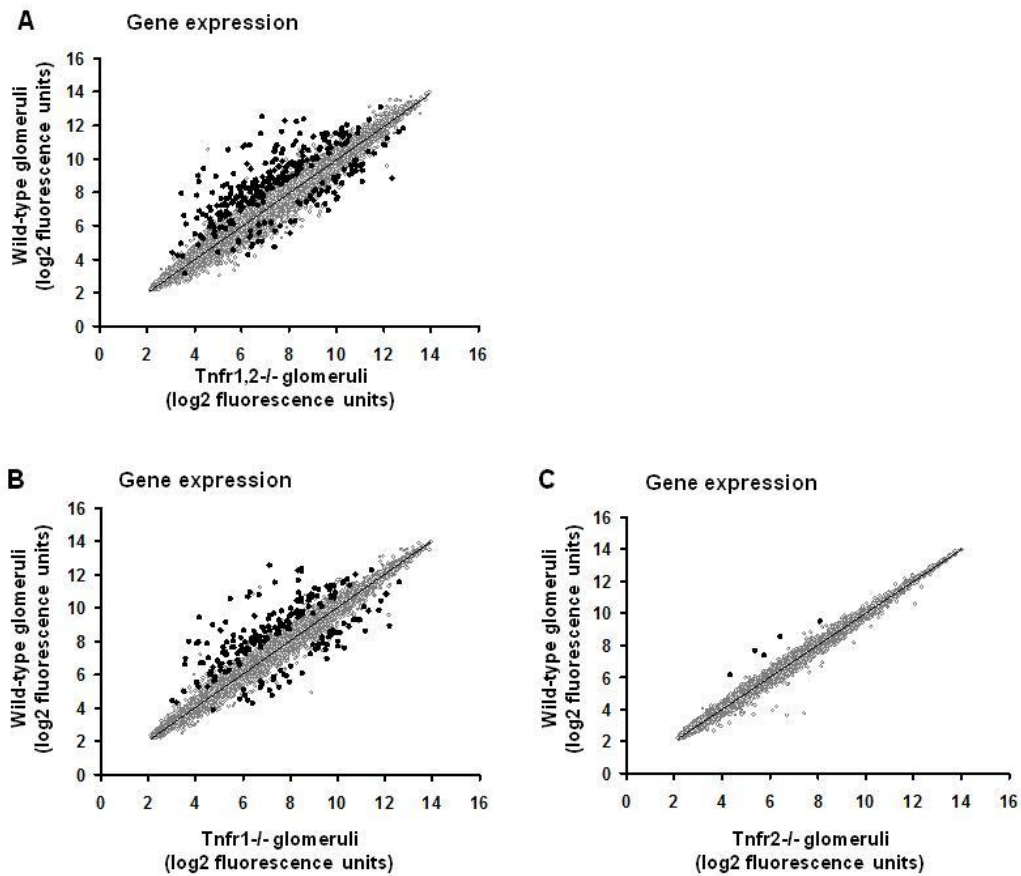


Abbildung 22: Der Anteil gleichsinnig bzw. differenziell Tnfr-abhängig exprimierter Gene in TNF-stimulierten Glomeruli.

Mit Hilfe der XY-Punktdiagramme sind die jeweiligen Anteile der differenziell regulierten Gene (schwaze Punktwolken) und nicht differenziell regulierten Gene (graue Punktwolken) in Wildtyp- vs Tnfr1,2-/- (**A**), Wildtyp- vs Tnfr1-/- (**B**) und Wildtyp- vs Tnfr2-/- Glomeruli (**C**) dargestellt.

4.8.1 Tnfr1-abhängig regulierte Gene

Der Vergleich der Transkriptionsprofile in den TNF-stimulierten Glomeruli von Wildtyp- und Tnfr1^{-/-} Mäusen ergab zunächst 286 *Probe Sets*, die Tnfr1-abhängig differenziell reguliert werden. Allerdings kodieren einige der detektierten *Probe Sets* jeweils das gleiche Genprodukt. Aus den Expressionsniveaus aller *Probe Sets* des gleichen Gens wurden daher Mittelwerte gebildet. Entsprechend ergab sich eine Anzahl von 219 differenziell regulierten Genen (Abbildung 22, B; Abbildung 23; Tabelle A1). Davon waren in Abwesenheit von Tnfr1 im Vergleich zu Wildtyp 159 vermindert und 60 verstärkt exprimiert. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms *Genesis 1.0* [114] visualisiert und in Form einer „*Heatmap*“ dargestellt (Abbildung 23). Die Tnfr1-abhängigen differenziellen Expressionsmuster sind farblich markiert. Dabei ist eine verstärkte Expression in Tnfr1^{-/-} Glomeruli verglichen mit Wildtyp rot markiert, verminderte Expression ist grün und schwarz entspricht der mittleren Expression.

Es zeichnete sich eine starke Übereinstimmung zwischen den Expressionsprofilen von TNF-stimulierten Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli ab, die sich von den ihrerseits ähnlichen Expressionsprofilen von Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli stark unterscheiden (Abbildung 23).

Bei Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} regulierten Genen führte die Abwesenheit von Tnfr2 zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigten 165 von 219 Genen in Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli (Tabelle 8, Tabelle A3) ähnliche Expressionsmuster wie bei Tnfr1^{-/-}. Die restlichen 54 Gene wiesen gleiche Expressions-Tendenzen wie bei Tnfr1^{-/-} auf, erreichten aber keine Signifikanz der differentiellen Expression. Die vollständige Auflistung zu allen 219 Tnfr1-abhängig exprimierten Genen ist im Anhang (Tabelle A1) aufgelistet.

In den folgenden Analysen wurde der Fokus auf die Tnfr1-regulierten Gene gerichtet und deren Expressionsmuster in Tnfr1^{-/-} sowie Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli detailliert analysiert.

Tnfr1^{-/-} versus Wildtyp

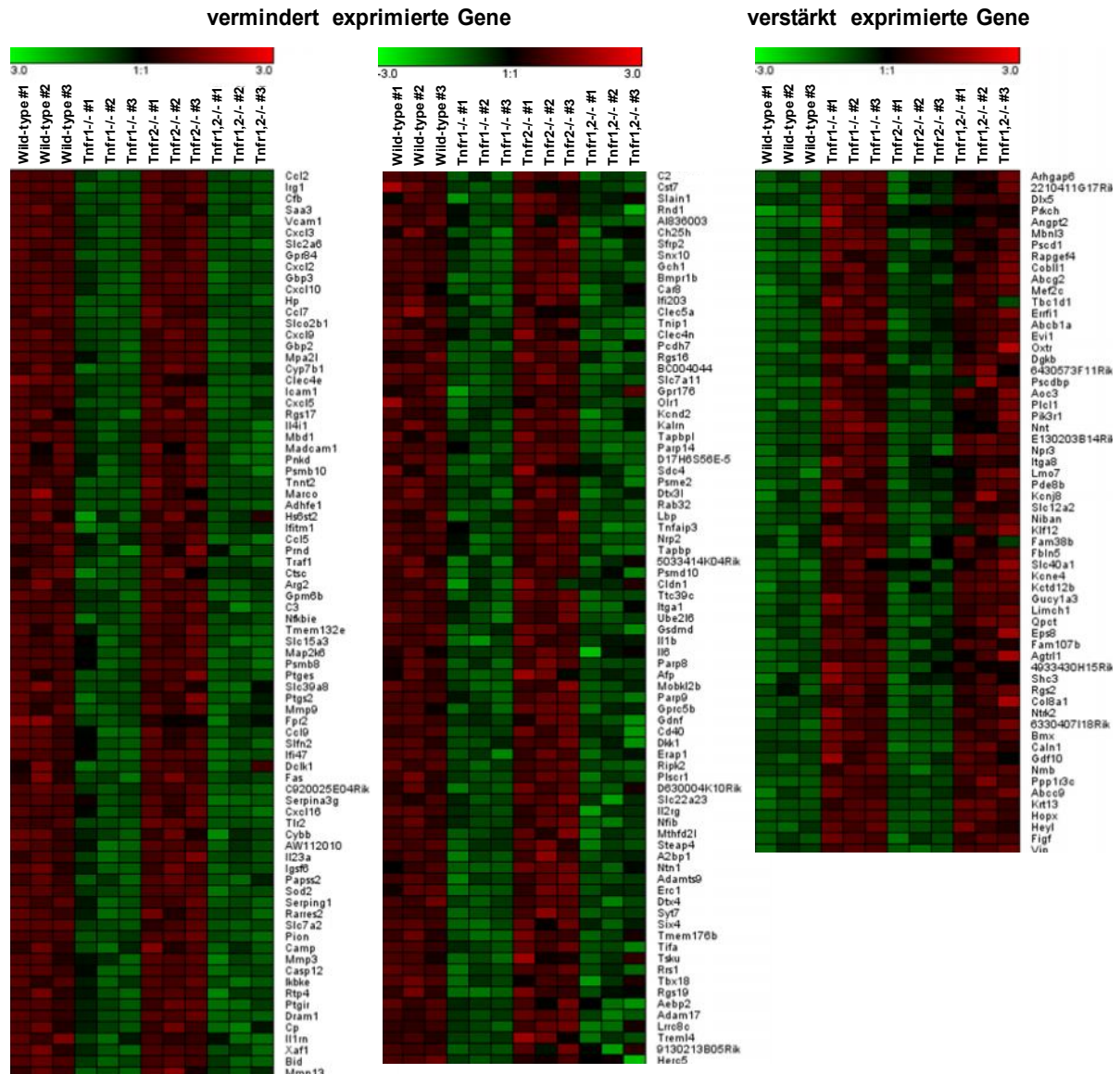


Abbildung 23: Visuelle Darstellung der 219 Tnfr1-abhängig regulierten Gene als „Heatmap“. Microarray-Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen pro Genotyp (Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-}, Tnfr1,2^{-/-}) durchgeführt und die Expressionswerte (in jeweils drei Spalten pro Genotyp) farblich dargestellt. Die abgebildeten Expressionsprofile zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Glomeruli 159 vermindert exprimierte Gene (grün) und 60 verstärkt exprimierte Gene (rot) in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli. Die Intensität der Farbe zeigt die Änderung der jeweiligen Genexpression gegenüber dem normalisierten Fluoreszenzsignal (schwarz entspricht der mittleren Expression) an. Die Zahlen in der Farblegende geben den Faktor dieser Veränderung an.

Aus den 219 Tnfr1-abhängig exprimierten Genen wurden 141 ausgewählt und dargestellt, die eine wichtige Rolle bei dem Entzündungsprozess einnehmen. Tabelle 8 stellt als Ergebnis für jedes Gen das Expressionsprofil in den drei Mausstämmen Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp dar. Dabei werden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen (n=3) für den jeweiligen Mausstamm eingesetzt und als Expressions-Unterschiede (*fold changes*) der Tnfr-defizienten Glomeruli zu den Glomeruli im Wildtyp gezeigt. Negative Werte stellen eine verminderte Expression dar, was für die meisten der Gene in Abwesenheit von Tnfr1 galt.

Die Genliste (Tabelle 8) beinhaltet verschiedene Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel Icam-1, Vcam-1, *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* (Madcam-1) oder Integrin-1 α , die in Tnfr1^{-/-} Glomeruli vermindert exprimiert wurden. Darüber hinaus waren auch verschiedene Chemokine der CXC- und CC-Unterfamilie in Tnfr1^{-/-} Glomeruli vermindert exprimiert. Das proinflammatorische Chemokin Ccl2/Mcp-1 war dabei das am stärksten Tnfr1-abhängig herunterregulierte Gen (-42,9-fach). Außerdem wurden auch proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 β und Interleukin-6 in Tnfr1-abhängiger Art und Weise exprimiert. Ferner wurden auch Effektoren und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, einschließlich Komplementkomponenten, *Lipopolysaccharide*-(LPS)-bindendes Protein (LBP) und Toll-like-Rezeptor 2 (Tlr2) in Tnfr1^{-/-} Glomeruli vermindert exprimiert. Auch diverse Komponenten und Regulatorgene der NF-kB-Signalkaskade wurden in Tnfr1^{-/-} Glomeruli geringer exprimiert. Des Weiteren wurden auch verschiedene Apoptose-Regulatoren (Fas, Caspase 12) und Matrix-Metallopeptidasen (3, 9 und 13) Tnfr1-abhängig reguliert.

Zusammenfassend ergab diese Analyse, dass in TNF-stimulierten Glomeruli Tnfr1 eine wichtige Rolle bei der Expression von verschiedenster Entzündungsmediatoren spielt.

Tabelle 8: Gene mit Tnfr1-abhängigem Expressionsmuster (Auswahl).

Gezeigt sind Expressionsunterschiede (*fold changes*) von 141 Genen in TNF-stimulierten Tnfr1-/- Glomeruli im Vergleich zum Wildtyp; n=3 pro Genotyp. Negative Werte kennzeichnen herunterregulierte Gene. n.s = nicht signifikant.

GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change versus Wt		
			Tnfr1-/-	Tnfr2-/-	Tnfr1,2-/-
		<u>Cell adhesion proteins</u>			
NM_016674	Cldn1	claudin 1	-2.4	n.s.	n.s.
NM_007739	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1	3.8	n.s.	n.s.
NM_011812	Fbln5	fibulin 5	2.9	n.s.	2.7
NM_015819	Hs6st2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	-5.4	n.s.	n.s.
NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	-9.9	n.s.	-15.4
NM_001033228	Itga1	integrin alpha 1	-2.4	n.s.	-2.3
NM_001001309	Itga8	integrin alpha 8	2.7	n.s.	1.9
NM_201529	Lmo7	LIM domain only 7	2.7	n.s.	n.s.
NM_013591	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	-6.1	n.s.	-9.1
NM_010939	Nrp2	neuropilin 2	-2.4	n.s.	-3.1
NM_018764	Pcdh7	protocadherin 7	-2.7	n.s.	n.s.
NM_011693	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	-22.1	n.s.	-23.8
		<u>Chemokines</u>			
NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-42.9	n.s.	-50.0
NM_013653	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-5.2	n.s.	-10.6
NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-14.7	n.s.	-11.2
NM_011338	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-3.9	n.s.	-5.4
NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-18.0	n.s.	-24.9
NM_203320	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-19.4	n.s.	-22.4
NM_009141	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-8.3	n.s.	-7.8
NM_008599	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-14.0	n.s.	-5.4
NM_021274	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-15.0	n.s.	-21.0
NM_023158	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-3.6	n.s.	-6.2

<u>Cytokines and cytokine receptors</u>					
NM_011611	Cd40	CD40 antigen	-2.1	n.s.	n.s.
NM_008361	Il1b	interleukin 1 beta	-2.3	n.s.	-1.7
NM_031167	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	-3.0	n.s.	-3.2
NM_013563	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	-2.0	n.s.	-2.9
NM_031168	Il6	interleukin 6	-2.3	n.s.	n.s.
NM_031252	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	-3.5	n.s.	-3.2
<u>Innate immune effectors and receptors</u>					
NM_013484	C2	complement component 2 (within H-2S)	-2.9	n.s.	-3.1
NM_009778	C3	complement component 3	-4.5	n.s.	-5.2
NM_009921	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide	-3.2	n.s.	-3.3
NM_008198	Cfb	complement factor B	-34.0	n.s.	-35.2
NM_019948	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-10.2	n.s.	-13.2
NM_020001	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-2.7	n.s.	-4.1
NM_021364	Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	-2.7	n.s.	-2.8
NM_008039	Fpr2	formyl peptide receptor 2	-3.9	n.s.	-3.4
NM_008489	Lbp	lipopolysaccharide binding protein	-2.5	n.s.	-2.5
NM_138648	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.6	n.s.	-2.5
NM_011315	Saa3	serum amyloid A 3	-24.7	n.s.	-25.5
NM_009776	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	-3.4	n.s.	-4.1
NM_011905	Tlr2	toll-like receptor 2	-3.6	n.s.	-3.8
<u>Antigen presentation proteins</u>					
NM_010724	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	-4.3	n.s.	-8.0
NM_013640	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	-5.7	n.s.	-7.9
NM_016883	Psmd10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	-2.4	n.s.	n.s.
NM_011190	Psme2	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	-2.5	n.s.	-2.7
NM_009318	Tapbp	TAP binding protein	-2.4	n.s.	-2.9
NM_145391	Tapbpl	TAP binding protein-like	-2.5	n.s.	-3.2

<u>NF-κB factors and regulators</u>					
NM_019777	Ikbke	inhibitor of kappaB kinase epsilon	-3.1	n.s.	-4.2
NM_008690	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	-4.5	n.s.	-3.9
NM_138952	Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	-2.1	n.s.	-2.2
NM_145133	Tifa	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain	-1.8	n.s.	-2.1
NM_009397	Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-2.5	n.s.	-3.9
NM_021327	Tnip1	TNFAIP3 interacting protein 1	-2.7	n.s.	-3.4
NM_009421	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-4.9	n.s.	-4.8
<u>Apoptosis regulators</u>					
NM_007544	Bid	BH3 interacting domain death agonist	-2.9	n.s.	-3.1
NM_009808	Casp12	caspase 12	-3.2	n.s.	-3.8
NM_027878	Dram1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	-3.0	n.s.	-4.0
NM_007987	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-3.7	n.s.	-3.3
NM_010275	Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor	-2.2	n.s.	-2.8
NM_011085	Pik3r1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	2.6	n.s.	n.s.
NM_009251	Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	-3.7	n.s.	-9.4
NM_013671	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-3.4	n.s.	-4.2
NM_001037713	Xaf1	XIAP associated factor 1	-2.9	n.s.	-3.0
<u>Cell cycle, proliferation and differentiation regulators</u>					
NM_007426	Angpt2	angiopoietin 2	2.1	n.s.	n.s.
NM_007560	Bmpr1b	bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-2.7	n.s.	-3.4
NM_010216	Figf	c-fos induced growth factor	6.4	n.s.	5.3
NM_010260	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	-13.5	n.s.	-14.4
NM_018734	Gbp3	guanylate nucleotide binding protein 3	-17.4	n.s.	-20.8
NM_145741	Gdf10	growth differentiation factor 10	4.8	n.s.	n.s.
NM_010215	Il4i1	interleukin 4 induced 1	-6.8	n.s.	-8.6
NM_134163	Mbnl3	muscleblind-like 3 (Drosophila)	2.1	n.s.	n.s.

NM_027852	Rarres2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	-3.4	n.s.	-3.6
NM_009144	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2	-2.8	n.s.	-3.0
NM_011382	Six4	sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	-1.8	n.s.	-1.6
NM_023814	Tbx18	T-box18	-1.8	n.s.	n.s.
<u>Cytoskeletal proteins and regulators</u>					
NM_009707	Arhgap6	Rho GTPase activating protein 6	1.8	n.s.	n.s.
NM_010662	Krt13	keratin 13	5.7	n.s.	6.5
NM_172612	Rnd1	Rho family GTPase 1	-2.8	n.s.	-3.8
NM_011521	Sdc4	syndecan 4	-2.5	n.s.	n.s.
NM_011619	Tnnt2	troponin T2, cardiac	-5.6	n.s.	-5.0
<u>Proteases</u>					
NM_009615	Adam17	a disintegrin and metallopeptidase domain 17	-1.7	n.s.	-1.9
NM_175314	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.9	n.s.	-1.8
NM_009982	Ctsc	cathepsin C	-4.8	n.s.	-5.7
NM_030711	Erap1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-2.1	n.s.	-1.8
NM_010809	Mmp3	matrix metallopeptidase 3	-3.2	n.s.	-4.8
NM_013599	Mmp9	matrix metallopeptidase 9	-4.0	n.s.	-3.6
NM_008607	Mmp13	matrix metallopeptidase 13	-2.9	n.s.	-2.4
<u>Metabolic enzymes</u>					
NM_175236	Adhfe1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	-5.5	n.s.	-5.5
NM_009705	Arg2	arginase type II	-4.5	n.s.	-6.4
NM_007592	Car8	carbonic anhydrase 8	-2.7	n.s.	n.s.
NM_009890	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	-2.8	n.s.	n.s.
NM_007825	Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	-10.5	n.s.	-6.4
NM_022415	Ptges	prostaglandin E synthase	-4.3	n.s.	-4.2
NM_011198	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-4.1	n.s.	-3.8

<u>Transport proteins and channels</u>					
NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.3	n.s.	2.0
NM_011511	Abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	5.4	n.s.	3.1
NM_011920	Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.2	n.s.	2.5
NM_007752	Cp	ceruloplasmin	-3.0	n.s.	-3.8
NM_019697	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-2.6	n.s.	n.s.
NM_021342	Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	3.0	n.s.	3.4
NM_008428	Kcnj8	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	2.8	n.s.	n.s.
NM_175429	Kctd12b	potassium channel tetramerisation domain containing 12b	3.0	n.s.	3.9
NM_026405	Rab32	RAB32, member RAS oncogene family	-2.5	n.s.	-2.4
NM_023386	Rtp4	receptor transporter protein 4	-3.1	n.s.	-3.5
NM_172659	Slc2a6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	-19.2	n.s.	-27.8
NM_007514	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-3.4	n.s.	-3.5
NM_011990	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-2.7	n.s.	-2.7
NM_009194	Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	2.8	n.s.	2.1
NM_023044	Slc15a3	solute carrier family 15, member 3	-4.4	n.s.	-8.8
NM_001033167	Slc22a23	solute carrier family 22, member 23	-2.0	n.s.	n.s.
NM_026228	Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	-4.1	n.s.	-3.7
NM_016917	Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	3.0	n.s.	n.s.
NM_175316	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-14.3	n.s.	-5.1
NM_028035	Snx10	sorting nexin 10	-2.8	n.s.	-2.5
NM_054098	Steap4	STEAP family member 4	-2.0	n.s.	-2.2
NM_018801	Syt7	synaptotagmin VII	-1.8	n.s.	-1.8
<u>Signaling molecules</u>					
NM_009759	Bmx	BMX non-receptor tyrosine kinase	4.2	n.s.	3.6
NM_178681	Dgkb	diacylglycerol kinase, beta	2.5	n.s.	2.2
NM_010051	Dkk1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	-2.1	n.s.	-1.9

NM_021896	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	3.0	n.s.	2.6
NM_001164268	Kalrn	kalirin, RhoGEF kinase	-2.5	n.s.	-2.7
NM_011943	Map2k6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	-4.3	n.s.	-6.9
NM_172263	Pde8b	phosphodiesterase 8B	2.7	n.s.	2.1
NM_009658	Plcl1	phospholipase C-like 1	2.6	n.s.	n.s.
NM_008856	Prkch	protein kinase C, eta	2.1	n.s.	n.s.
NM_019688	Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2.2	n.s.	2.3
NM_009061	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	3.7	n.s.	n.s.
NM_011267	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	-2.7	n.s.	-2.6
NM_019958	Rgs17	regulator of G-protein signaling 17	-8.0	n.s.	-8.6
NM_026446	Rgs19	regulator of G-protein signaling 19	-1.7	n.s.	n.s.
NM_019636	Tbc1d1	TBC1 domain family, member 1	2.3	n.s.	n.s.
<u>Transcription factors and regulators</u>					
NM_198854	Dlx5	distal-less homeobox 5	2.0	n.s.	1.8
NM_013905	Heyl	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	6.0	n.s.	4.7
NM_175606	Hopx	HOP homeobox	5.9	n.s.	5.7
NM_010636	Klf12	Kruppel-like factor 12	2.9	n.s.	n.s.
NM_013594	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	-6.2	n.s.	-8.9
NM_025282	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2.3	n.s.	2.2
NM_008687	Nfib	nuclear factor I/B	-2.0	n.s.	-2.4
NM_001081009	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	-2.2	n.s.	-2.2
NM_030253	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	-2.2	n.s.	-2.7
NM_001039530	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	-2.5	n.s.	-3.9

4.8.1.1 Einteilung Tnfr1-abhängig regulierter Gene in funktionelle Gruppen

Im nächsten Schritt wurden die potentiellen Funktionen der 219 Tnfr1-differenziell regulierten Gene mit Hilfe der Software DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, the sixth version, 2003-2008*) näher untersucht. Die Analyse ergab sieben funktionelle Gengruppen mit einer statistisch signifikant veränderten Regulation in Tnfr1-/- Glomeruli, ausgedrückt durch den sog. „*Enrichment Score*“: 1) Chemokine und Zytokine, 2) Integrale Membranmoleküle und -rezeptoren, 3) Effektoren des angeborenen Immunsystems, 4) Matrix-Metallopeptidasen, 5) Zink-bindende Proteine, 6) Ionentransport-Proteine und 7) negative Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (Tabelle 9).

Alle Mitglieder der funktionellen Gruppe „Chemokine und Zytokine“ waren im Vergleich zur Wildtyp-Glomeruli in Tnfr1-/- Glomeruli stark herunterreguliert (*Enrichment score* 7,1). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in den Gruppen „Effektoren des angeborenen Immunsystems“ und „Matrix-Metallopeptidasen“ (*Enrichment scores* 2,77 und 2,05) beobachtet. Des Weiteren ergab die DAVID basierte Analyse der Tnfr1,2-/- differenziell regulierten Gene in Glomeruli (Tabelle A4) ähnliche Ergebnisse wie in Tnfr1-/- Glomeruli. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine bedeutende Rolle von Tnfr1 in TNF-stimulierten Glomeruli hin.

Tabelle 9: Einteilung der in Tnfr1-/- Glomeruli differenziell exprimierten Gene in funktionelle Gengruppen.

Gezeigt sind funktionelle Gengruppen, die einen *Enrichment score* von $\geq 1,3$ ($p < 0,05$) in TNF-stimulierten Tnfr1-/- Glomeruli im Vergleich zum Wildtyp erreicht haben; Negative Werte kennzeichnen herunterregulierte Gene.

GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change Tnfr1-/- versus WT
<u>Functional group 1: Chemokines and cytokines (enrichment score 7.61)</u>			
NM_023158	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-3.6
NM_203320	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-19.4
NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-18.0
NM_009141	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-8.3
NM_008599	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-14.0
NM_021274	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-15.0
NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-42.9
NM_031252	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	-3.5
NM_013653	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-5.2
NM_011338	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-3.9
NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-14.7
<u>Functional group 2: Integral membrane molecules and receptors (enrichment score: 3.65)</u>			
NM_011920	Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.2
NM_009318	Tapbp	TAP binding protein	-2.4
NM_011990	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-2.7
NM_007514	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-3.4
NM_010766	Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-5.6
NM_030720	Gpr84	G protein-coupled receptor 84	-19.0
NM_008967	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)	-3.1
NM_201367	Gpr176	G protein-coupled receptor 176	-2.6
NM_010939	Nrp2	neuropilin 2	-2.4
NM_011784	Agtr1	angiotensin receptor-like 1	3.3
XM_144956	Oxtr	oxytocin receptor	2.5
NM_022420	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	-2.2

NM_138648	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.6
NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	-9.9
NM_010398	C920025E04Rik	RIKEN cDNA C920025E04 gene	-3.7
NM_145391	Tapbp1	TAP binding protein-like	-2.5
NM_013591	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	-6.1
NM_001033167	Slc22a23	solute carrier family 22, member 23	-2.0
NM_011521	Sdc4	syndecan 4	-2.5
NM_008489	Lbp	lipopolysaccharide binding protein	-2.5
NM_011693	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	-22.1
NM_019948	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-10.2
NM_023122	Gpm6b	glycoprotein m6b	-4.5
NM_133897	Lrrc8c	leucine rich repeat containing 8 family, member C	-1.7
NM_020001	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-2.7
NM_021364	Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	-2.7
NM_023056	Tmem176b	transmembrane protein 176B	-1.8
NM_175316	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-14.3
NM_015819	Hs6st2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	-5.4
NM_145562	9130213B05Rik	RIKEN cDNA 9130213B05 gene	-1.6
NM_023386	Rtp4	receptor transporter protein 4	-3.1
NM_023438	Tmem132e	transmembrane protein 132E	-4.4
NM_001039485	Fam38b	family with sequence similarity 38, member B	2.9

Functional group 3: Innate immune effectors (enrichment score: 2.77)

NM_009778	C3	complement component 3	-4.5
NM_009776	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	-3.4
NM_013484	C2	complement component 2 (within H-2S)	-2.9
NM_008198	Cfb	complement factor B	-34.0
NM_017370	Hp	haptoglobin	-15.0

Functional group 4: Matrix metallopeptidases (enrichment score: 2.05)

NM_013599	Mmp9	matrix metallopeptidase 9	-4.0
-----------	------	---------------------------	------

NM_008607	Mmp13	matrix metalloproteinase 13	-2.9
NM_009615	Adam17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17	-1.7
NM_010809	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	-3.2

Functional group 5: Zinc ion binding proteins (enrichment score: 1.66)

NM_007592	Car8	carbonic anhydrase 8	-2.7
NM_172442	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-1.8
NM_001013371	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)	-2.5
NM_178061	Mobk12b	MOB1, Mps one binder kinase activator-like 2B (yeast)	-2.2

Functional group 6: Ion transport proteins (enrichment score: 1.38)

NM_019697	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-2.6
NM_007807	Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide	-3.5
NM_016917	Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	3.0
NM_009194	Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	2.8
NM_021342	Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	3.0
NM_008428	Kcnj8	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	2.8

Functional group 7: Negative regulators of G-protein signaling (enrichment score: 1.37)

NM_009061	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	3.7
NM_011267	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	-2.7
NM_026446	Rgs19	regulator of G-protein signaling 19	-1.7
NM_019958	Rgs17	regulator of G-protein signaling 17	-8.0

4.8.1.2 Zuordnung der Tnfr1-abhängig regulierten Gene zu „biologischen Prozessen“

In folgendem Abschnitt wurden die Tnfr1-abhängig regulierten Gene hinsichtlich der Zuordnung zur *Gene Ontology*-(GO)-Kategorie „biologische Prozesse“ untersucht. Unter Einsatz vom DAVID konnten die 219 Tnfr1-abhängig regulierten Gene 77 verschiedenen biologischen Prozessen zugeordnet werden. In Tabelle 10 sind die 10 statistisch am signifikantesten Tnfr1-abhängig regulierten GO-Kategorien aufgelistet. Die vollständige Auflistung aller 77 GO-Kategorien ist im Anhang (Tabelle A5) dargestellt. Viele der identifizierten GO-Kategorien sind stark immunbezogen, wie zum Beispiel Chemokin-Aktivität, Chemokin-Rezeptor-Bindung, Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation oder Chemotaxis.

Tabelle 10: Zuordnung der 219 Tnfr1-regulierten Gene zu biologischen Prozessen (Auswahl).

Die Spalten 1 und 2 kennzeichnen den entsprechenden *GO-Term* durch eine Identifikationsnummer und den Namen des Prozesses, in Spalte 3 ist *fold enrichment*, in Spalte 5 ist die Anzahl der in dieser Arbeit identifizierten, zu diesem Prozess gehörenden Gene und in Spalte 6 ihr zugehörige prozentuale Anteil bezogen auf die Gesamtanzahl dargestellt. Biologische Prozesse mit einem *EASE score* von $p \leq 0,05$, einem *fold enrichment* $\geq 1,5$ und mindestens vier Gene pro Gruppe wurden als signifikant reguliert betrachtet.

GO term ID	GO term name	Fold enrichment	P-value	Gene count	% of regulated genes
GO:0008009	chemokine activity	22.8	3.54E-10	10	4.26
GO:0042379	chemokine receptor binding	22.3	4.53E-10	10	4.26
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	14.1	2.69E-03	4	1.70
GO:0001664	G-protein-coupled receptor binding	13.9	3.62E-08	10	4.26
GO:0006953	acute-phase response	12.5	3.79E-03	4	1.70
GO:0008217	regulation of blood pressure	9.2	2.05E-03	5	2.13
GO:0043123	positive regulation of I-kB kinase/NF-kB cascade	8.5	1.15E-02	4	1.70
GO:0002526	acute inflammatory response	8.3	4.97E-05	8	3.40
GO:0006935	chemotaxis	8.2	8.50E-07	11	4.68
GO:0042330	taxis	8.2	8.50E-07	11	4.68

4.8.1.3 Zuordnung Tnfr1-abhängig regulierter Gene zu KEGG-Signalwegen

Die GO-Kategorie „biologische Prozesse“ stellt eine Reihe von Ereignissen dar, die durch das Zusammenspiel mehrerer molekularer Funktionen hervorgerufen werden. Ein biologischer Prozess ist nicht mit einem Signalweg (*KEGG-pathway*) gleichzusetzen. Für einen Signalweg müssen auch Interaktionen und Abhängigkeiten zwischen einzelnen Komponenten genau beschrieben sein. Hierfür greift DAVID unter anderem auf die sogenannte KEGG-Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [118] zurück. Die dort enthaltenen *KEGG*-Signalwege fassen Gene zusammen, die über Regulationsmechanismen miteinander interagieren und graphisch in Netzwerken dargestellt werden. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Signalwegen, in denen die identifizierten Tnfr1-regulierten Gene involviert sind.

54 der 219 Tnfr1-abhängig regulierten Gene konnten sechs verschiedenen Signalwegen zugeordnet werden, nämlich Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion, Toll-like-Rezeptor-Signalweg, Zelladhäsionsmoleküle, transendotheliale Leukozytenmigration, Komplement- und Koagulationskaskade und Apoptose (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zuordnung Tnfr1-abhängig regulierter Gene zu zellulären Signalwegen.

Ausgehend von 219 Tnfr1-abhängig regulierten Genen wurden 54 Genen sechs KEGG-Signalwegen zugeordnet. Tnfsf7 (*TNF superfamily member 7*), Tgfbr1-Typ I (*transforming growth factor- β type I receptor*), Bmpr1b-Typ I (*bone morphogenetic proteins β type I receptor*), Tlr2 (*toll-like receptor 2*), Pi3k (*phosphoinositide 3-kinases*), Lbp (*lipopolysaccharide-binding protein*), Mkk3/6 (*MAPK kinase 3/6*), Vcam-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), Icam-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*), Nox2/gp91phox (*NADPH oxidase 2*), Mmp (*matrix metalloproteinase*), Cam (*cell-adhesion molecules*), Epac (*exchange factor directly activated by cAMP*), Madcam-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*), Sdc (*Syndecan*), Itga8 (*integrin alpha-8*), Bf (*complement factor B*), C1s (*complement component 1, s*), C2 (*complement component 2*), C3 (*complement component 3*), Serping1 (*serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1*), Bid (*BCL-2 Interacting Domain*).

KEGG-Signalweg	Involvierte Tnfr1-abhängig regulierte Gene	
	Anzahl	Gensymbol
„Cytocine-cytocinereceptor interaction“	18	Cxcl2, Cxcl5, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl16 Ccl2, Ccl5, Ccl7, Ccl9 Il-1 β , Il-6, Il-23A Il2rgy Fas, Cd40, Tnfsf7 Tgfbr1-Typ I, Bmpr1b-Typ I
„Toll-like receptor signaling pathway“	11	Tlr2, Pi3k, Lbp, Ikk β , Ikk ϵ , Mkk3/6, Il-1 β , Il-6, Cd40, Cxcl10, Cxcl9
„Leukozyte transendothelial migration“	7	Vcam-1, Icam-1, Pi3k, Nox, Mmps, Cams, Epac
„Cell adhesion molecules (CAMs)“ & MHC-I-Moleküle	8	Vcam-1, Icam-1, Madcam-1, Sdc, Itga8
„Complement and coagulation cascade“	5	Bf, C1s, C2, C3, Serping1
„Apoptosis“	5	Fas, Bid, Il-1, Ikk, Pi3k

4.8.1.3.1 KEGG-Signalweg: Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion

Die meisten der Tnfr1-regulierten Gene sind im Signalweg „Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion“ involviert. Das Diagramm in Abbildung 24 zeigt fünf Zytokin-Zytokinrezeptorfamilien dieses Signalwegs auf, nämlich die Chemokin-, Hämatopoetin-, *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), TNF- und *transforming growth factor* (TGF)- β Rezeptorfamilie. 18 der 219 Tnfr1-abhängig regulierten Gene sind Bestandteil dieser Familien, ausgenommen der PDGF-Familie. Diese 18 Gene waren im vorangegangenen *Microarray*-Experiment sowohl in Tnfr1-/- als auch in Tnfr1,2-/- Glomeruli, das heißt in Abwesenheit von Tnfr1, signifikant vermindert exprimiert. In Abbildung 24 werden sie analog zur Darstellung der *Microarray*-Ergebnisse im Signalweg durch grüne Sterne (Tnfr1-/-Glomeruli) und grüne Kreise (Tnfr1,2-/- Glomeruli) hervorgehoben.

Die Chemokine sind durch die größten Unterfamilien, nämlich die CXC- und CC-Chemokine vertreten. Im Signalweg werden die Interaktionen zwischen Chemokinen und entsprechenden Chemokinrezeptoren dargestellt. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass in der CXC-Chemokin-Unterfamilie die Liganden Cxcl2, Cxcl5, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl16 und in der CC-Chemokin-Unterfamilie die Liganden Ccl2, Ccl5, Ccl7 und Ccl9 Tnfr1-abhängig reguliert sind. Einige dieser Liganden aktivieren den gleichen Rezeptor, wie zum Beispiel die beiden CXC-Chemokine Cxcl2 und Cxcl5, die an den Il8rb-Rezeptor binden.

Die zweite Zytokin-Zytokinrezeptorfamilie bildet die Hämatopoetin-Familie, in der Wachstumsfaktoren und zahlreiche Interleukine zusammengefasst werden. Auffällig ist, dass die Expression eines wichtigen Rezeptors in der Familie der Interleukine, nämlich die γ -Kette des Il-2-Rezeptors Tnfr1-abhängig reguliert wird. Die γ -Kette des Il-2-Rezeptors ist an dem Aufbau der Klasse-I-Zytokinrezeptoren beteiligt. Darunter fallen die Rezeptoren für die Interleukine Il-2, -4, -7, -9, -15 und -21. Des Weiteren wurden auch zwei Interleukin-Liganden, nämlich Il-6 und Il-23a in Glomeruli Tnfr1-abhängig reguliert. Traditionell wird Il-6 als Aktivator der Akut-Phase-Proteine und als Lymphozyten-stimulierender Faktor angesehen. Il-6 ist an der Regulation der Leukozyten-Apoptose beteiligt und zwar mit proapoptotischer und antiapoptotischer Wirkungsweise [126].

Interleukin-23 ist ein Zytokin der IL-12-Zytokin-Familie. Es vermittelt die Aktivierung und Differenzierung von Th17-Zellen und führt dadurch zu einer verstärkten Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-17 und IL-22.

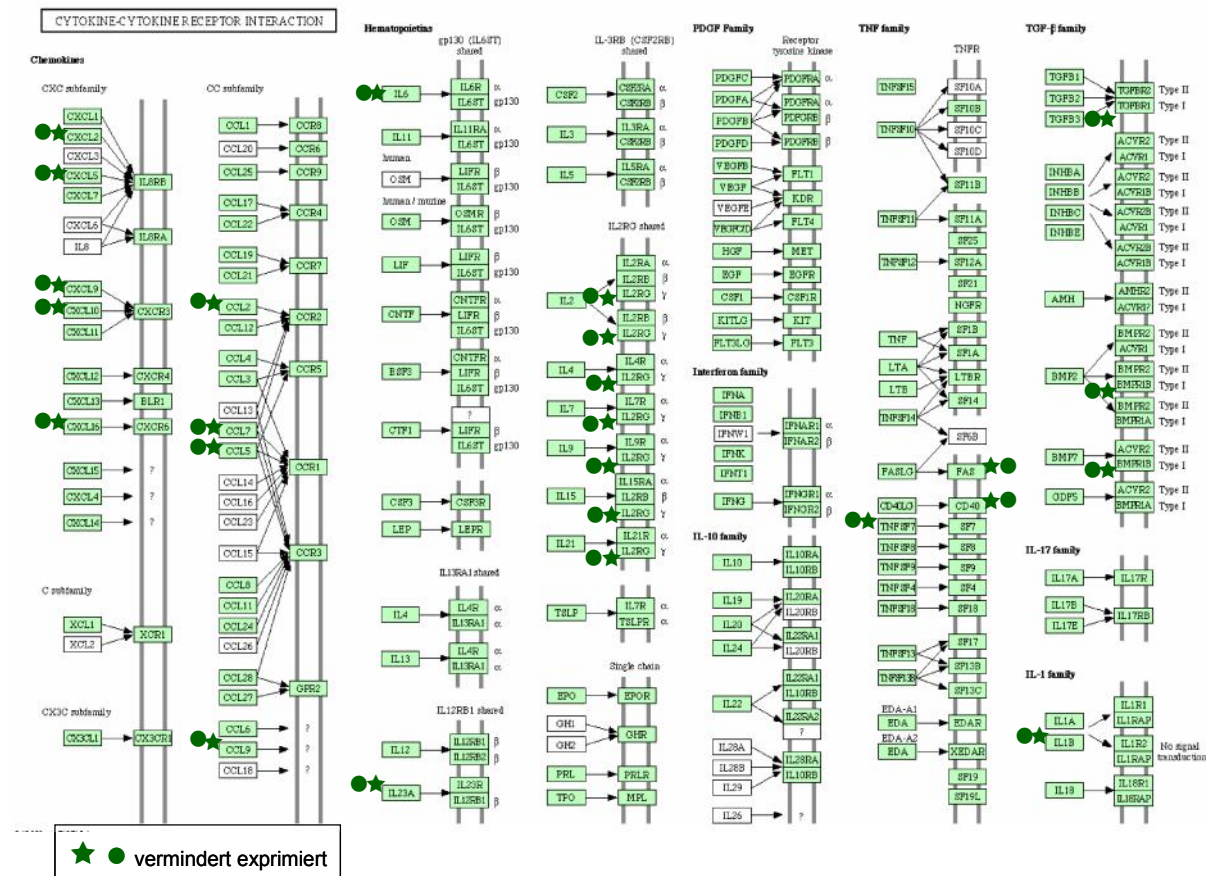


Abbildung 24: KEGG-Signalweg „Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion“.

Die hellgrün unterlegten Kästchen stellen Organismus-spezifische Signalwege in der Maus dar. Liganden-Rezeptor-Interaktionen sind durch Pfeile dargestellt. Alle 18 Gene waren in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli vermindert exprimiert. Entsprechend der *Microarray*-Darstellung (*Heatmap*) sind diese Gene durch grüne Sterne bei verminderter Expression in Tnfr1-/- und durch grüne Kreise bei verminderter Expression in Tnfr1,2-/- Glomeruli gekennzeichnet. Damit wird die gleichsinnige Expression dieser Gene in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli deutlich [116].

Auch die TNF/Tnfr-Superfamilie beinhaltet einige Tnfr1-abhängig regulierte Gene. Dazu gehören der Ligand *TNF superfamily member 7* (Tnfsf7/Cd70l) und die Rezeptoren Cd40 und Fas.

Die vierte Zytokinfamilie mit Tnfr1-abhängig regulierten Genen bildet schließlich die TGF- β -Familie. Die TGF- β -Familie umfasst TGF- β 1-, - β 2-, - β 3-Isoformen, Activine, *bone morphogenetic proteins* (Bmps) sowie *growth and differentiation factors* (Gdfs). Aus der *Microarray*-Analyse ging hervor, dass die Expression von Tgf β 1 in Glomeruli durch Tnfr1 reguliert wird (Abbildung 24). Des Weiteren wurde die Expression des Bmp Typ I Rezeptors (Bmpr1b) der Liganden Bmp2 und Bmp7 ebenfalls durch Tnfr1 reguliert (Abbildung 24).

Die proinflammatorischen Schlüsselzytokine Interleukin-1 (Il-1) und TNF sind wichtige entzündungsfördernde Signalstoffe. Die Expression von Il-1 β in TNF-stimulierten Glomeruli wird in Tnfr1-abhängiger Weise reguliert (Abbildung 24).

4.8.1.3.2 Toll-like-Rezeptor-Signalweg

Die 11 Tnfr1-abhängig regulierten Gene in diesem Signalweg sind in dem unten dargestellten Diagramm durch grüne Sterne (Tnfr1-/- Glomeruli) und grüne Kreise (Tnfr1,2-/- Glomeruli) hervorgehoben (Abbildung 25). Dabei wird ersichtlich, dass Tnfr1 die Expression von Toll-like Rezeptor 2 (Tlr2) in Glomeruli reguliert. Tlr2 gehört zur Gruppe der *Pattern Recognition Receptors* (PRR), welche der Erkennung von *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) und endogene Liganden, so genannten *Danger/Damager-associated Molecular Patterns* (DAMP) dienen, die meist aus sterbenden Zellen und entzündetem Gewebe des Wirtes stammen. Die dem Tlr2/Tlr1-Komplex nachgeschaltete Signalkaskade führt unter anderem über Phosphatidylinositol-3-Kinase (Pi3k) zur indirekten Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Il-1 β und Il-6. Aus der vorangegangenen *Microarray*-Analyse ging hervor, dass sowohl Pi3k als auch die genannten Zytokine in Glomeruli durch Tnfr1 reguliert sind (Abbildung 25).

Interessanterweise reguliert Tnfr1 in Glomeruli auch das LPS bindendes Protein (Lbp-Protein) (Abbildung 25). Der Lbp-Lps-Komplex bindet an dem Cd14-Rezeptor, was zur Aktivierung von Tlr4 und einer daraus resultierenden Induktion von sowohl MyD88-abhängigen als auch MyD88-unabhängigen Signalwegen führt.

Über die MyD88-abhängige Signalkaskade ist eine Expression proinflammatorischer Zytokine induzierbar. An dieser Signalkaskade sind weitere Tnfr1-regulierte Gene beteiligt, zum Beispiel die Ikk β -Untereinheit des Ikk-Komplexes und *MAPK kinase 3/6* (Mkk3/6). In dem MyD88-unabhängigen Signalweg reguliert Tnfr1 über Ikk ϵ den Ikk ϵ /Tbk1-Komplex (Abbildung 25) und dadurch die Expression von Cd40 und den Chemokinen Cxcl10/Ip-10 und Cxcl9/Mig.

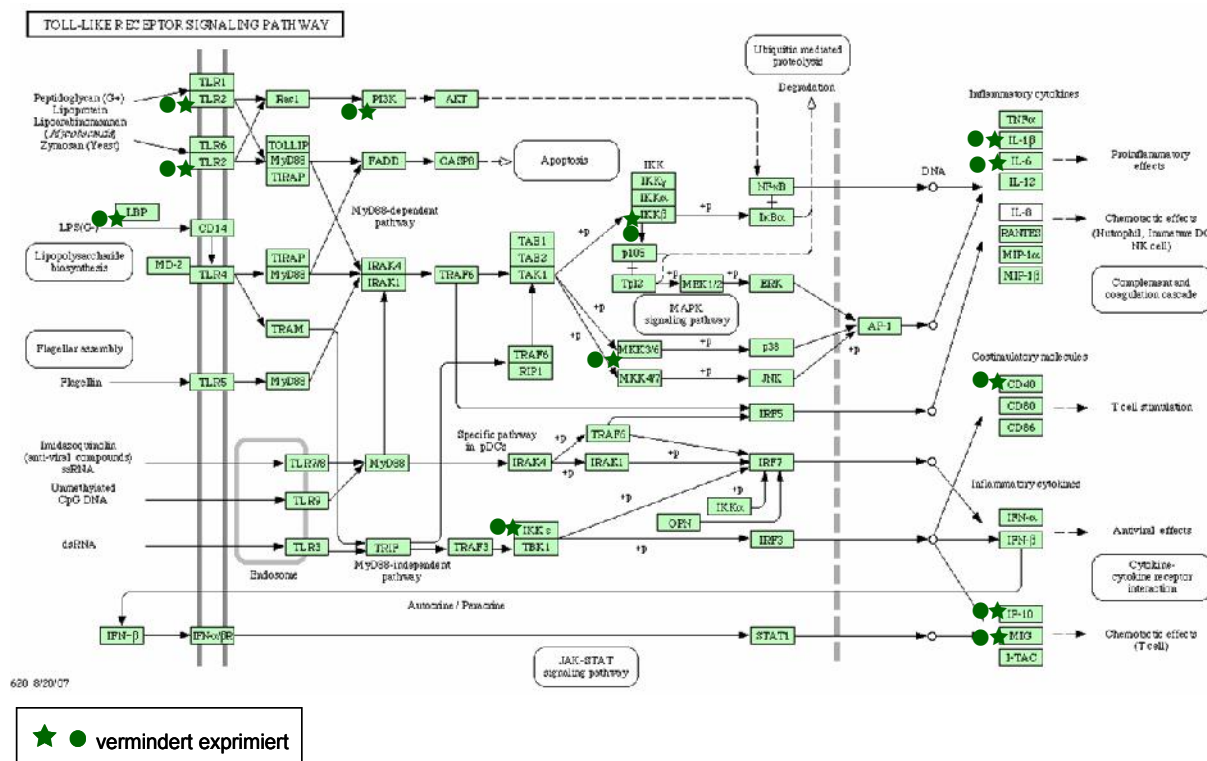


Abbildung 25: Toll-like-Rezeptor-Signalweg mit Tnfr1-abhängig regulierten Genen.

Die hellgrünen Kästchen stellen Maus-spezifische Signalwege dar. Alle 11 Gene waren in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli vermindert exprimiert. Entsprechend der *Microarray*-Darstellung (*Heatmap*) sind diese Gene durch grüne Sterne bei verminderter Expression in Tnfr1-/- und durch grüne Kreise bei verminderter Expression in Tnfr1,2-/- Glomeruli dargestellt. Es wird die gleichsinnige Expression dieser Gene in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli deutlich [116].

4.8.1.3.3 Transendotheliale Leukozytenmigration

Der dritte Signalweg, in dem sieben Tnfr1-abhängig regulierte Gene involviert sind, ist die transendotheliale Leukozytenmigration (Abbildung 26). Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen erfolgt über einen mehrstufigen Prozess, bei dem jeder Einzelschritt Voraussetzung für den Nächsten ist (vgl. Abschnitt 2.4.1, Abbildung 7).

In Abbildung 26 sind die Signalwege dargestellt, die während der Adhäsion und Transmigration der Leukozyten aktiviert werden. Die Expression der beiden wichtigen an dem Adhäsions- und Transmigrationsprozess beteiligten Adhäsionsmoleküle Icam-1 und Vcam-1 [127] wird in TNF-stimulierten Glomeruli durch Tnfr1 reguliert (Abbildung 26). Sowohl Icam-1 als auch Vcam-1 benötigen für die Vermittlung der Prozesse eine Bindung an das Aktinzytoskelett [128].

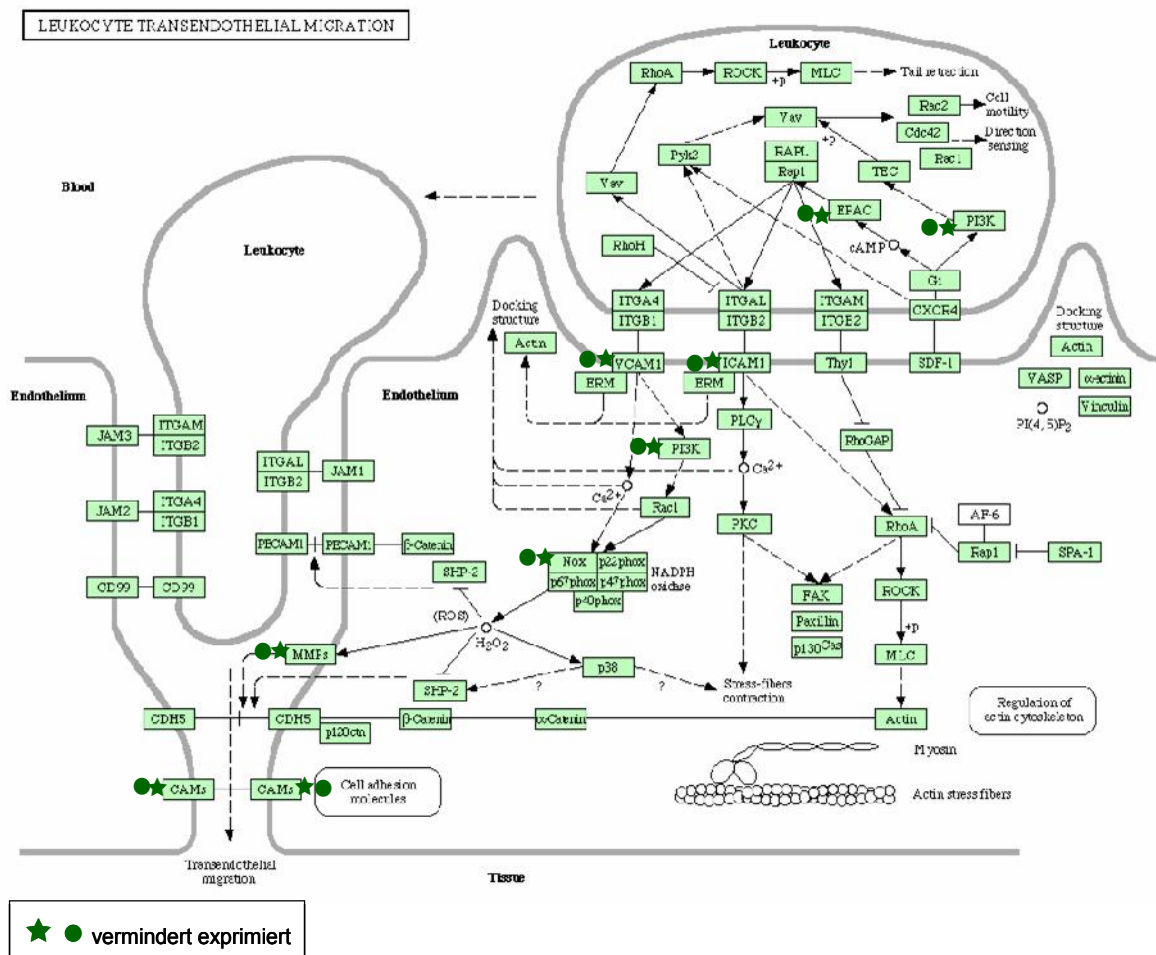


Abbildung 26: Signalweg „transendotheliale Leukozytenmigration“.

Der dargestellte Signalweg zeigt die Schritte „Feste Adhäsion“ und „Leukozytentransmigration“ und die an den Prozessen beteiligten Tnfr1-abhängig regulierten Gene. Alle sieben Gene waren in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli vermindert exprimiert. Entsprechend der *Microarray*-Darstellung (*Heatmap*) sind diese Gene durch grüne Sterne bei vermindelter Expression in Tnfr1-/- und durch grüne Kreise bei vermindelter Expression in Tnfr1,2-/- Glomeruli dargestellt. Es wird die gleichsinnige Expression dieser Gene in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli deutlich [116].

Der Signalweg aus Abbildung 26 zeigt auch, dass sowohl eine Icam-1- als auch Vcam-1-Aktivierung Veränderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und die Kontraktion von Stressfasern bedingt. Diese Kontraktion bewirkt eine Formveränderung der Endothelzellen [129], die zu einer Störung der Zell-Zell-Kontakte [130] und dadurch zu einer erhöhten Permeabilität führt.

Darüber hinaus reguliert Tnfr1 neben Vcam-1 auch weitere Gene der Signalkaskade distal von Vcam-1, wie Pi3k, das eine Aktivierung der endothelialen NADPH-Oxidase veranlasst. Zusätzlich reguliert Tnfr1 die NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox (Nox2). Im weiteren Verlauf der Vcam-1-Signalkaskade aktivieren vor allem durch NADH generierte ROS (reaktive Sauerstoffradikale) die Matrixmetalloproteinasen (Mmp), die eine wichtige Rolle beim Umbau der vaskulären Basalmembran und der Extrazellulärmatrix spielen. Die Expression dieser Matrixmetalloproteinasen wird ebenfalls durch Tnfr1 reguliert (Abbildung 26).

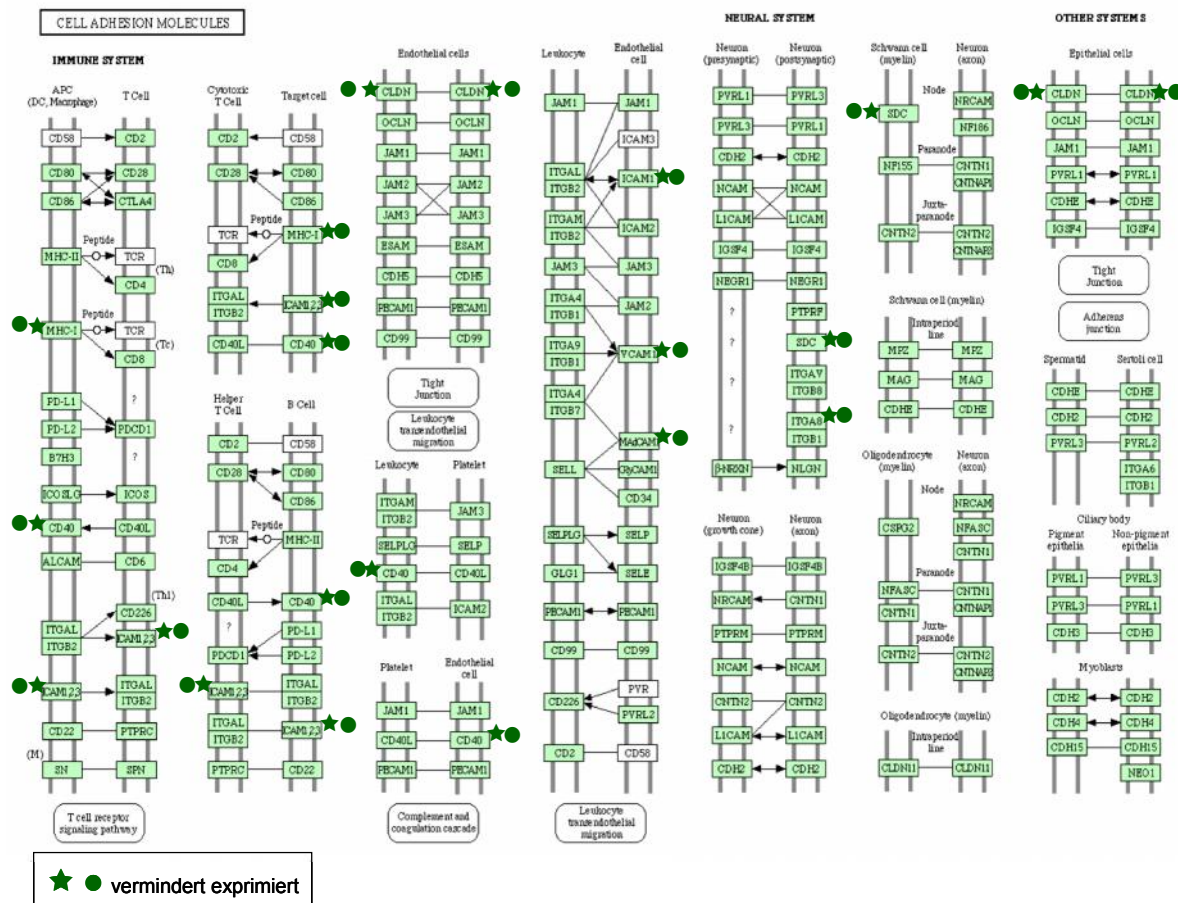
Zu den ROS gehört unter anderem das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Dieses kann durch die Superoxiddismutase (SOD) in membranpermeables Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden. Interessanterweise wird auch die Expression von SOD durch Tnfr1 reguliert (Daten nicht im Signalweg gezeigt).

4.8.1.3.4 Zelladhäsionsmoleküle

Es wurden acht Tnfr1-abhängig regulierte Gene identifiziert, die zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehören und Interaktionen sowohl zwischen Zellen innerhalb des Immunsystems als auch zwischen Zellen des Immunsystems und Parenchymzellen steuern (Abbildung 27). Bei der Darstellung der Interaktionen zwischen Zellen des Immunsystems sind in diesem Diagramm neben Adhäsionsmolekülen auch MHC Klasse I-Moleküle und Cd40 gezeigt, da diese in Glomeruli ebenfalls durch Tnfr1 reguliert werden. An den Interaktionen zwischen den Zellen des Immunsystems und den Endothelzellen werden drei Adhäsionsmoleküle durch Tnfr1 reguliert, nämlich Icam-1, Vcam-1 und Madcam-1.

Abbildung 27: Der Signalweg „Zelladhäsionsmoleküle“.

124



4.8.1.3.5 Komplement und Koagulationskaskade

Die Analyse des KEGG-Signalwegs „Komplement und Koagulationskaskade“ ergab fünf Tnfr1-abhängig regulierte Gene. Dabei handelt es sich um die Komplementkomponenten Faktor B (Bf), C1s, C2 und C3 (Abbildung 28). Des Weiteren regulierte Tnfr1 auch *Serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1* (Serping1), ein zu den Serpinen gehörender Serin-Protease-Inhibitor, der die Aktivierung des Komplementfaktors C1 kontrolliert [131].

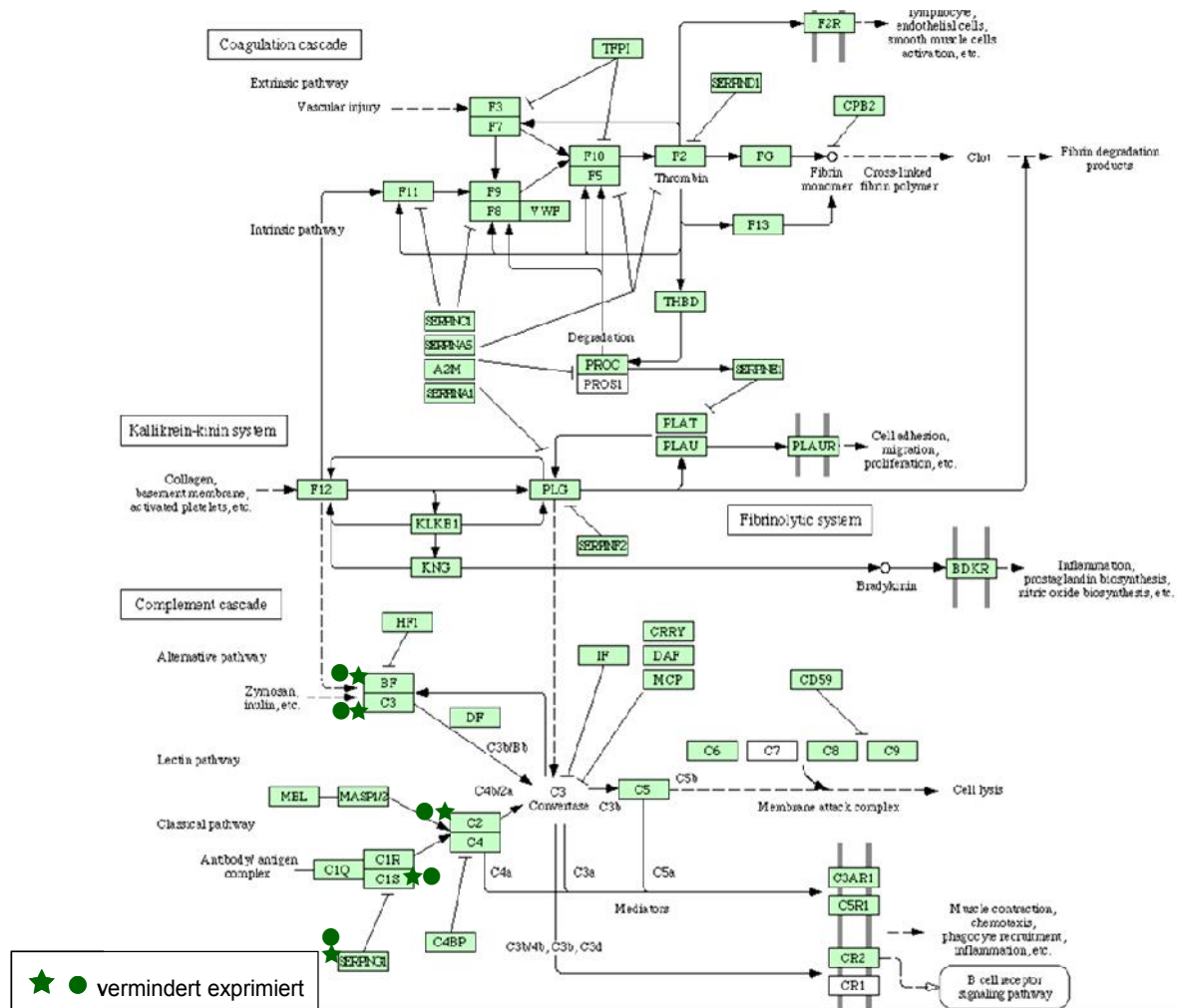


Abbildung 28: Der Signalweg „Komplement und Koagulationskaskade“.

Der dargestellte Signalweg zeigt die an diesen Prozessen beteiligten, durch Tnfr1 regulierten Gene. Alle fünf vorkommenden Gene waren in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli vermindert exprimiert. Entsprechend der *Microarray*-Darstellung (*Heatmap*) sind diese Gene durch grüne Sterne für vermindert exprimierte Gene in Tnfr1-/- und durch grüne Kreise für vermindert exprimierte Gene in Tnfr1,2-/- Glomeruli hervorgehoben. Es wird die gleichsinnige Expression dieser Gene in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli deutlich [116].

4.8.1.3.6 Apoptose

Im untersuchten KEGG-Signalweg wurden fünf Tnfr1-abhängig regulierte Apoptose-Gene identifiziert, nämlich Fas/Cd95-Rezeptor, *BCL-2 Interacting Domain* (Bid), Il-1, *phosphoinositide 3-kinases* (Pi3k) und IκB Kinase Komplex (Ikk). Einige dieser Gene sind an der Apoptose-induzierenden Signalkaskade beteiligt, andere wiederum sind Apoptose-Inhibitoren.

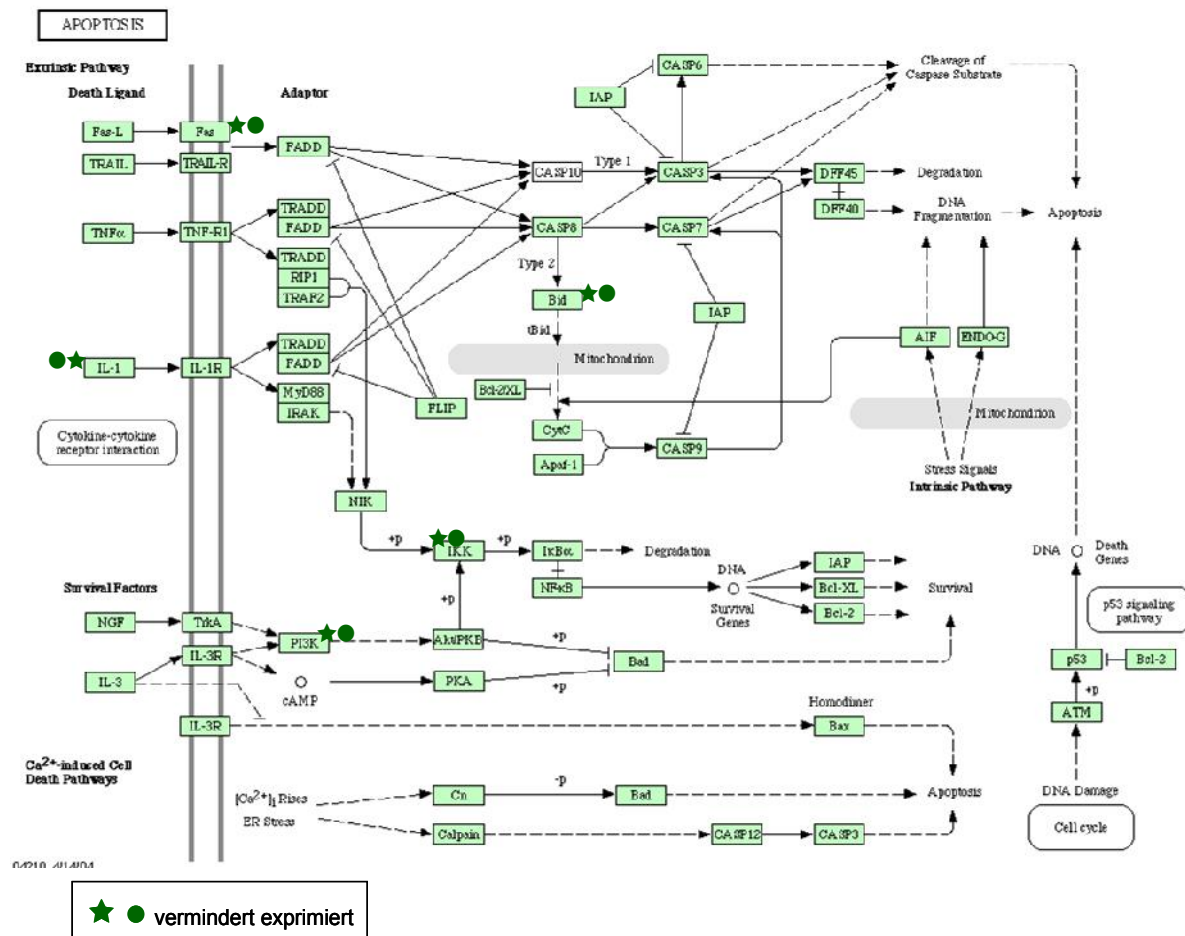


Abbildung 29: Der Signalweg „Apoptose“.

Der dargestellte Signalweg zeigt die Tnfr1-abhängig regulierten Gene, welche die Apoptose induzieren beziehungsweise hemmen können. Alle fünf vorkommenden Gene waren in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli vermindert exprimiert. Entsprechend der *Microarray*-Darstellung (*Heatmap*) sind diese Gene durch grüne Sterne bei vermindelter Expression in Tnfr1^{-/-} und durch grüne Kreise bei vermindelter Expression in Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli dargestellt. Es wird die gleichsinnige Expression dieser Gene in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli deutlich [116].

4.8.2 Tnfr2-abhängig regulierte Gene

Analog zu Tnfr1 erfolgte auch für Tnfr2 eine *Microarray*-Analyse. Überraschenderweise ergab der Vergleich der Expressionsprofile von Wildtyp- und Tnfr2-defizienten Glomeruli nur fünf signifikant Tnfr2-abhängig regulierte Gene. Dazu zählten neben Tnfr2/Tnfrsf1b selbst Ccdc 109b, Rab6b und zwei weitere Gene mit unbekannter Funktion, nämlich OTTMUG00000010657 und 1700029101Rik.

Alle Gene waren in Abwesenheit von Tnfr2 vermindert exprimiert, wie zum Beispiel die kleinmolekulare GTPase Rab6b. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms *Genesis 1.0* visualisiert, um einen direkten Vergleich der Expressionsmuster zwischen den vier Mausstämmen zu ermöglichen. Die Rezeptorabhängigen differenziellen Expressionsmuster sind farblich markiert. Dabei kennzeichnet rot eine verstärkte, grün eine verminderte und schwarz die mittlere Expression (Abbildung 30).

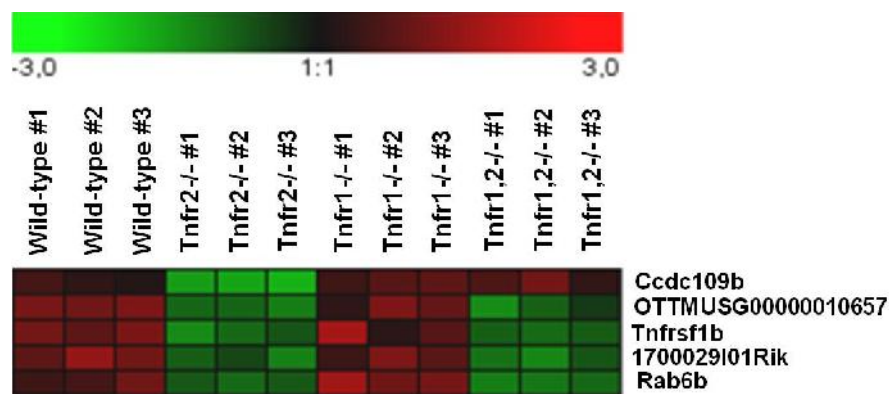


Abbildung 30: Visuelle Darstellung der Tnfr2-abhängig regulierten Gene als „Heatmap“.

Microarray-Experimente wurden in dreifacher Ausführung pro Genotyp (Wildtyp, Tnfr2-/-, Tnfr1-/-, Tnfr1,2-/-) durchgeführt und die Expressionswerte (in jeweils drei Spalten pro Genotyp #1 bis #3) farblich dargestellt. Die abgebildeten Expressionsprofile zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Glomeruli fünf vermindert exprimierte Gene (grün) in Tnfr2-/- und vier (ausgenommen Ccdc109b) in Tnfr1,2-/- Glomeruli, während in Tnfr1-/- Glomeruli eine zu Wildtyp vergleichbare Expression vorlag. Die Intensität der Farbe zeigt die Änderung der jeweiligen Genexpression gegenüber dem normalisierten Fluoreszenzsignal (schwarz entspricht der mittleren Expression). Die Zahlen in der Farblegende geben den Faktor dieser Veränderung an.

Es zeichnete sich eine starke Übereinstimmung zwischen den Expressionsprofilen von TNF-stimulierten Wildtyp- und Tnfr1-/- Glomeruli ab, die sich von den ihrerseits ähnlichen Expressionsprofilen von Tnfr2-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli stark unterscheiden (Abbildung 30, Tabelle 12).

Letztere wiesen in dem Expressionsprofil von Ccdc109b einen Unterschied auf. Während die Ccdc109b-Expression in Abwesenheit von Tnfr2 vermindert war, kam es in Wildtyp-, Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli zu einer verstärkten Expression.

In Tabelle 12 sind die Expressionsunterschiede (*Fold changes*) der fünf signifikanten Tnfr2-abhängig exprimierten Gene in Tnfr2^{-/-}, Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli im Vergleich zu Wildtyp-Glomeruli dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen *Microarray*-Analysen. Negative Werte stellen dabei vermindert exprimierte Gene dar, was in Tnfr2^{-/-} Glomeruli für alle Gene zutraf.

Tabelle 12: Gene mit Tnfr2-abhängigem Expressionsmuster.

Gezeigt sind die Unterschiede (*fold changes*) im Vergleich zum Wildtyp; n=3 pro Genotyp. Die negativen Werte kennzeichnen herunterregulierte Gene. n.s = nicht signifikant.

Affymetrix probe set ID	GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change versus Wt		
				Tnfr2 ^{-/-}	Tnfr1 ^{-/-}	Tnfr1,2 ^{-/-}
1418099_at	NM_011610	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	-4.9	n.s.	-4.4
1418778_at	NM_025779	Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B	-4.3	n.s.	n.s.
1424784_at	NM_001083918	OTTMUS G000000 10657	predicted gene, OTTMUSG00000010657	-3.5	n.s.	-3.2
1436574_at	NM_027285	1700029I 01Rik	RIKEN cDNA 1700029I01 gene	-3.1	n.s.	-3.4
1434914_at	NM_173781	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family	-2.6	n.s.	-3.2

4.9 Verifizierung ausgewählter Tnfr-abhängig regulierter Gene

4.9.1 Tnfr1-abhängig regulierte Chemokine und Adhäsionsmoleküle

Zur Bestätigung der evaluierten Genexpressionsprofile aus den vorangegangenen *Microarray*-Versuchen wurde im folgenden eine quantitative RT-PCR-Analyse der repräsentativen Tnfr1- regulierten Gene Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes, Icam-1, Vcam-1, E- und P-Selektin durchgeführt. Alle Gene waren in Abwesenheit von Tnfr1 (Tnfr1-/- Glomeruli) im *Microarray*-Experiment vermindert exprimiert. Dabei war Ccl2/Mcp-1 das am stärksten herunterregulierte Gen.

Die Verifizierung der Gene erfolgte an glomerulärer cDNA nach denselben Bedingungen des *Microarray*-Versuchs (12h, 50 ng/ml TNF). Für jedes dieser Gene wurde die Expression in den vier Genotypen Wildtyp-, Tnfr1-/-, Tnfr2-/- und Tnfr1,2-/- gemessen. In Ergänzung zum *Microarray*-Experiment wurden hierbei auch die Expressionen in unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF) und in mit zunehmenden TNF-Konzentrationen stimulierten Glomeruli analysiert.

Die in Abbildung 31, A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu jeweiligen unstimulierten Glomeruli die Ccl2-Expression nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation nur in Wildtyp- und Tnfr2-/- Glomeruli induziert wurde. In beiden Genotypen wird Tnfr1 exprimiert. Sie stieg in Wildtyp-Glomeruli um das 58-fache und in Tnfr2-/- Glomeruli sogar um das 97-fache an. Die Ccl2-Expression nahm mit zunehmender TNF-Konzentration zu. In stimulierten Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli war keine Expression zu verzeichnen. Beide Genotypen sind Tnfr1-defizient. Ihre Ccl2-Expressionswerte waren im Vergleich zum stimulierten Wildtyp signifikant vermindert. Somit konnte eine TNF-/Tnfr1-abhängige Ccl2-mRNA-Expression in den Glomeruli bestätigt werden.

Die Ccl5-Expression (Abbildung 31, B) nahm ebenfalls nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation nur in Wildtyp- und Tnfr2-/- Glomeruli zu, und zwar um das 11-beziehungsweise 6-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde in Tnfr1-/- und Tnfr1,2-/- Glomeruli keine Expression gemessen. Diese erwies sich im Vergleich zum stimulierten Wildtyp als signifikant vermindert. Infolgedessen konnte auch die TNF-/Tnfr1-abhängige Ccl5-mRNA-Expression in den Glomeruli bestätigt werden.

Da ebenfalls die Adhäsionsmoleküle Icam-1 und Vcam-1 im *Microarray*-Experiment in Glomeruli in einer Tnfr1-abhängigen Weise reguliert wurden, wurden auch diese Ergebnisse mit Hilfe der quantitativen RT-PCR verifiziert. Die Verifizierung der Gene erfolgte an gleichem Ausgangsmaterial wie bei den Chemokinen bereits beschrieben. Vergleichbar mit der Chemokin-Expression wird aus Abbildung 31, C ersichtlich, dass auch die Icam-1-Expression nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation mit 50 ng/ml nur in Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli anstieg. Sie erhöhte sich im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen um das 23-fache in Wildtyp- und um das 15-fache in Tnfr2^{-/-} Glomeruli. Wie bei den Chemokinen erfolgte auch bei Icam-1 die TNF-induzierte Expressionssteigerung konzentrationsabhängig. In Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli war dagegen keine induzierte Expression von Icam-1 festzustellen. Diese erwies sich als signifikant vermindert im Vergleich zum TNF-stimulierten Wildtyp nach 50 ng/ml TNF. Somit konnte die TNF-/Tnfr1-abhängige Icam-1-mRNA-Expression in TNF-stimulierten Glomeruli bestätigt werden.

Das gleiche Expressionsmuster wurde auch bei Vcam-1 beobachtet (Abbildung 31, D). Dabei erhöhte sich die Expression im Vergleich zu den Kontrollen um das 34-fache in mit 50 ng/ml TNF-stimulierten Wildtyp-Glomeruli und um das 49-fache in Tnfr2^{-/-} Glomeruli. Des Weiteren konnte auch eine fehlende Induktion der Vcam-1-Expression in TNF-stimulierten Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli im Vergleich zum stimulierten Wildtyp bestätigt werden.

Interessanterweise wurden auch eine signifikant verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin (Abbildung 31, E-F) mit Hilfe der quantitativen RT-PCR in TNF-stimulierten (50 ng/ml) Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli, nicht jedoch in Tnfr2^{-/-} Glomeruli im Vergleich zum stimulierten Wildtyp nachgewiesen, obwohl diese im *Microarray*-Versuch nicht als signifikant differenziell exprimiert identifiziert worden waren.

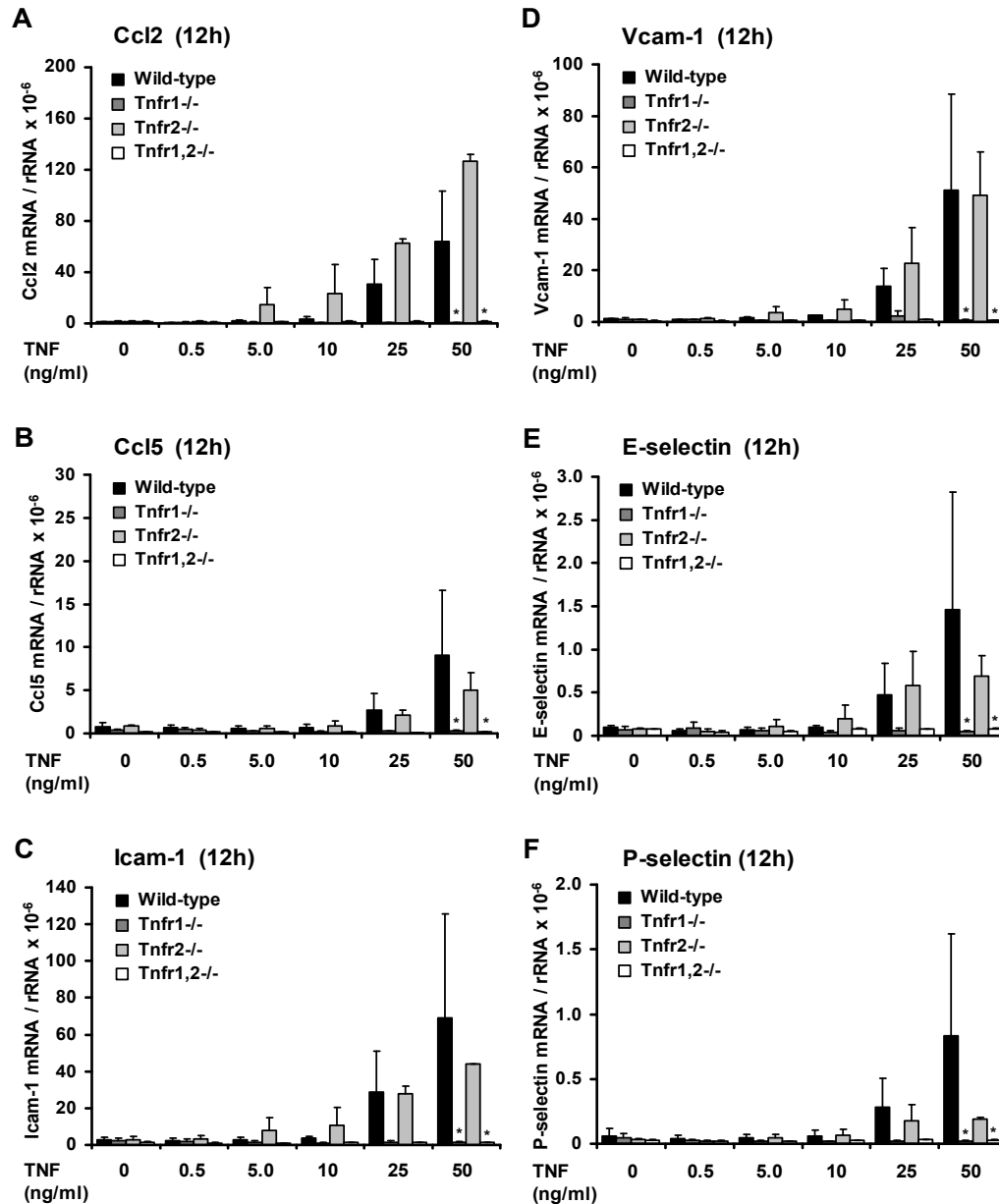


Abbildung 31: Verifizierung der repräsentativen Chemokine (A-B) und Adhäsionsmoleküle (C-F) aus Microarray-Versuchen.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe von RT-PCR an cDNA aus Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} defizienten Glomeruli *in vitro* nach 12 Stunden Stimulation mit 0,5, 5,0, 10, 25 und 50 ng/ml TNF. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle diente die cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10⁶ multipliziert. *p<0,05 versus mit gleicher TNF-Konzentration stimuliertem Wildtyp.

4.9.2 Verifizierung der Tnfr2-abhängigen Expression der Rab6b-GTPase

Unter den wenigen Tnfr2-abhängig exprimierten Genen wurde die kleinmolekulare Rab6b-GTPase im *Microarray*-Experiment identifiziert (Abschnitt 4.8.2). Dies war besonders interessant, da sie in der Literatur bisher noch nicht mit Tnfr2 in Verbindung gebracht wurde. Die Rab-GTPasen stellen mit über 60 Mitgliedern die größte Familie der Ras-ähnlichen GTPasen dar [132]. Alle Rab-Proteine fungieren als molekulare Schalter in zwei interkonvertierbaren Formen [133] und sind in unterschiedlichste intrazelluläre Regulationsprozesse, wie zum Beispiel Genexpression, Reorganisation des Zellzytoskellets, intrazellulärem Vesikeltransport und Transport zwischen Zytosol und Zellkern involviert.

Die *Microarray*-Ergebnisse demonstrieren zum ersten Mal eine Tnfr2-abhängige Rab6b-mRNA-Expression in Glomeruli. Daher wurde im vorliegenden Versuch die glomeruläre Rab6b-mRNA-Expression mit Hilfe der quantitativen RT-PCR analysiert (Abbildung 32). Die Verifizierung des Gens erfolgte an glomerulärer cDNA unter den gleichen Bedingungen wie im *Microarray*-Versuch (12h, 50 ng/ml TNF), zusätzlich wurden weitere TNF-Konzentrationen (0,5, 5,0 und 10 ng/ml TNF; 12h) mituntersucht. Die Expression des Gens wurde in den vier Genotypen Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} gemessen. Als Vergleichskontrolle diente cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). In Abbildung 32 dargestellten Ergebnisse zeigen eine konstitutive Rab6b-Expression in unstimulierten Wildtyp- und Tnfr1^{-/-} Glomeruli. In Abwesenheit von Tnfr2, d.h. in Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli, war die Rab6b-Expression konstitutiv deutlich vermindert exprimiert. Nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation blieb die mRNA-Expression in Wildtyp und in Tnfr1^{-/-} Glomeruli unverändert. In stimulierten Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli war unverändert eine signifikant verminderte Rab6b-Expression im Vergleich zu stimulierten Wildtyp-Glomeruli zu verzeichnen. Damit konnte das Rab6b-Genexpressionsmuster aus dem *Microarray*-Experiment bestätigt werden.

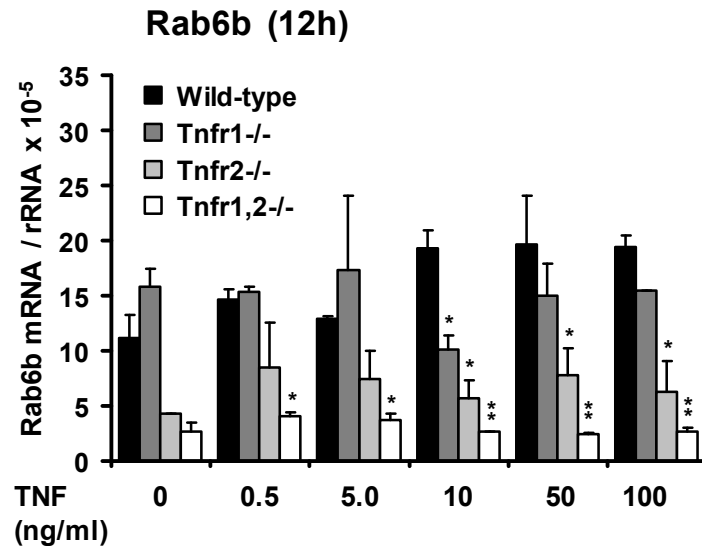


Abbildung 32: Verifizierung des Transkriptionsprofils von Rab6b.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe von RT-PCR an cDNA aus Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} defizienten Glomeruli *in vitro* nach 12 Stunden Stimulation mit 0,5, 5,0, 10, 50 und 100 ng/ml TNF. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen erhoben. Als interne Kontrolle diente die cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^5 multipliziert. *p<0,05 versus mit gleicher TNF-Konzentration stimuliertem Wildtyp; **p<0,01 versus mit gleicher TNF-Konzentration stimuliertem Wildtyp.

4.10 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Tnfr1-vermittelten glomerulären Genexpressionsmuster

Die Tnfr1-abhängige mRNA-Expression von Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes, Icam-1, Vcam-1, E-Selektin und P-Selektin konnte in Glomeruli nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation mit 50 ng/ml nachgewiesen werden (Abschnitt 4.9.1). Diesbezüglich ergibt sich die Frage, inwieweit dieses Expressionsmuster für eine längere TNF-Exposition und weitere TNF-Konzentrationen zutrifft. Um diese Frage zu beantworten, wurde im folgenden mittels RT-PCR-Analyse die Expression dieser Tnfr1-regulierten Genen nach einer 12- und 24-stündigen Stimulation der Glomeruli *in vitro* mit 0,5, 5, 10, 25 und 50 ng/ml TNF verglichen. Die Analyse der Gen-Expression erfolgte an glomerulärer cDNA aus vier Genotypen: Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-}. Als Vergleichskontrolle diente cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF).

Die in Abbildung 33, A-B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Ccl2-Expression mit steigender TNF-Konzentration (ab 5 ng/ml TNF) sowohl nach 12 als auch 24 Stunden nur in stimulierten Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli signifikant induziert wurde. 24 Stunden nach Stimulation mit niedrigen TNF-Konzentrationen (5 und 10 ng/ml) war die Ccl2-Expression jedoch auch in Tnfr2^{-/-} Glomeruli erniedrigt (signifikant bei 10 ng/ml TNF). In Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli war in Abwesenheit von Tnfr1 für beide Zeitpunkte keine Expression zu verzeichnen. Folglich vermittelt TNF konzentrationsabhängig über Tnfr1 die Ccl2-mRNA-Expression in Glomeruli. Allerdings scheint auch Tnfr2 für eine längeranhaltende Ccl2-Expresion nach Stimulation mit relativ niedrigen TNF-Konzentrationen erforderlich zu sein.

Des Weiteren wurde die Expression des Chemokins Ccl5/Rantes nach 12- und 24-stündiger TNF-Stimulation untersucht. Abbildung 33, C-D ist zu entnehmen, dass die Ccl5-mRNA-Expression sowohl nach 12- als auch 24-stündiger Stimulation und Konzentrationen ab 25 ng/ml TNF nur in Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli anstieg. Zusätzlich war die Ccl5-Expression in Tnfr2^{-/-} Glomeruli im Vergleich zu stimulierten Wildtyp-Glomeruli auch zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation mit 25 ng/ml TNF statistisch signifikant vermindert. Im Gegensatz dazu war in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli keine Expression zu verzeichnen. Zusammenfassend induziert TNF die Ccl5/Rantes-Expression präferentiell über Tnfr1 in Glomeruli sowohl nach 12 als auch 24 Stunden, wobei Tnfr2 insbesondere eine anhaltende Expression über 24 Stunden nach Stimulation mit niedrigen TNF-Konzentrationen vermittelt.

Vergleichbar mit der Chemokin-Expression wird aus Abbildung 33, E-F ersichtlich, dass auch die Icam-1-Expression mit zunehmender TNF-Konzentration (ab 5 ng/ml TNF) 12, aber auch 24 Stunden nach TNF-Gabe in Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli zunahm. In Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli war dagegen keine induzierte Expression festzustellen. Diese war im Vergleich zu Wildtyp statistisch signifikant vermindert zum Zeitpunkt 12 Stunden und einer TNF-Konzentration von 50 ng/ml und zum Zeitpunkt 24 Stunden bei Konzentrationen von 10, 25 und 50 ng/ml. Daraus kann man schließen, dass TNF konzentrationsabhängig sowohl nach 12 als auch 24 Stunden überwiegend über Tnfr1 die Icam-1-Expression vermittelt. Allerdings war nach 24-stündiger TNF-Stimulation mit 5 und 10 ng/ml die Icam-1-Expression auch in Tnfr2^{-/-} Glomeruli gegenüber Wildtyp vermindert (signifikant für 10 ng/ml TNF).

Nach sowohl 12 als auch 24 Stunden blieb eine Vcam-1-Expressionssteigerung in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli ebenfalls aus (Abbildung 34, G-H). Wie bei Icam-1 war diese statistisch signifikant vermindert zum Zeitpunkt 12 Stunden und einer TNF-Konzentration von 50 ng/ml und zum Zeitpunkt 24 Stunden bei Konzentrationen von 5, 10, 25 und 50 ng/ml. Ebenso zeigte sich nach 24-stündiger TNF-Stimulation mit 5 und 10 ng/ml die Vcam-1-Expression in Tnfr2^{-/-} Glomeruli vermindert (signifikant für 10 ng/ml TNF).

Ferner wurde auch die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin (Abbildung 34, I-J) und P-Selektin (Abbildung 34, K-L) für beide bereits genannten Zeitpunkte (12 und 24 Stunden) analysiert. Wie in Abschnitt 4.9.1 gezeigt, wurde eine signifikant verminderte Expression von E-Selektin und P-Selektin in TNF-stimulierten Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli (12h, 50 ng/ml) im Vergleich zum stimulierten Wildtyp nachgewiesen, obwohl diese im (weniger sensitiven) *Microarray*-Versuch nicht als differenziell exprimiert identifiziert werden konnten. Nach einer 24-stündigen TNF-Stimulation sank das Expressionsniveau der beiden Moleküle in Wildtyp- als auch in Tnfr2^{-/-} Glomeruli im Vergleich zur 12-stündigen TNF-Stimulation ab. In Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli erfolgte auch zum Zeitpunkt 24 Stunden keine signifikante Expression (Abbildung 34, J, L).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine langanhaltende Tnfr1-vermittelte Expression der untersuchten Chemokine und Adhäsionsmoleküle in TNF-stimulierten Glomeruli. Tnfr2 scheint jedoch zusätzlich die späte Expression dieser Gene nach Stimulation mit niedrigen TNF-Konzentrationen zu vermitteln.

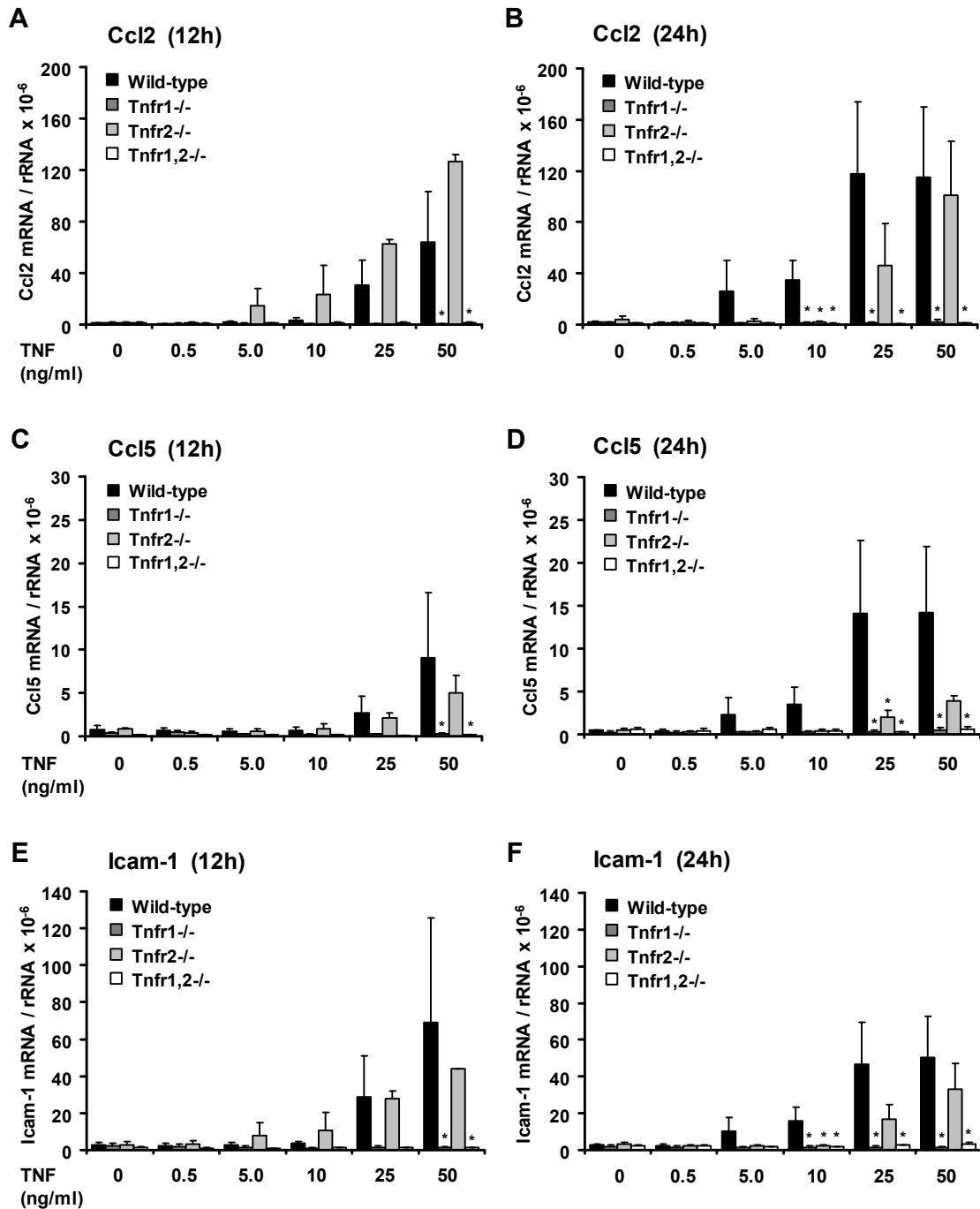


Abbildung 33: Vergleich der Transkriptionsprofile der Chemokine und Adhäsionsmoleküle nach einer 12- und 24-stündigen TNF-Stimulation.

Die cDNA wurde aus Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli nach 12- und 24-stündiger *in vitro* Stimulation mit 0,5, 5, 10, 25 und 50 ng/ml TNF gewonnen und analysiert. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden aus zwei bis (Zeitpunkt 12 Stunden) und drei bis vier (Zeitpunkt 24 Stunden) unabhängigen Versuchen erhoben. Als Kontrolle diente die cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10⁶ multipliziert. *p<0,05 versus mit gleicher TNF-Konzentration stimuliertem Wildtyp.

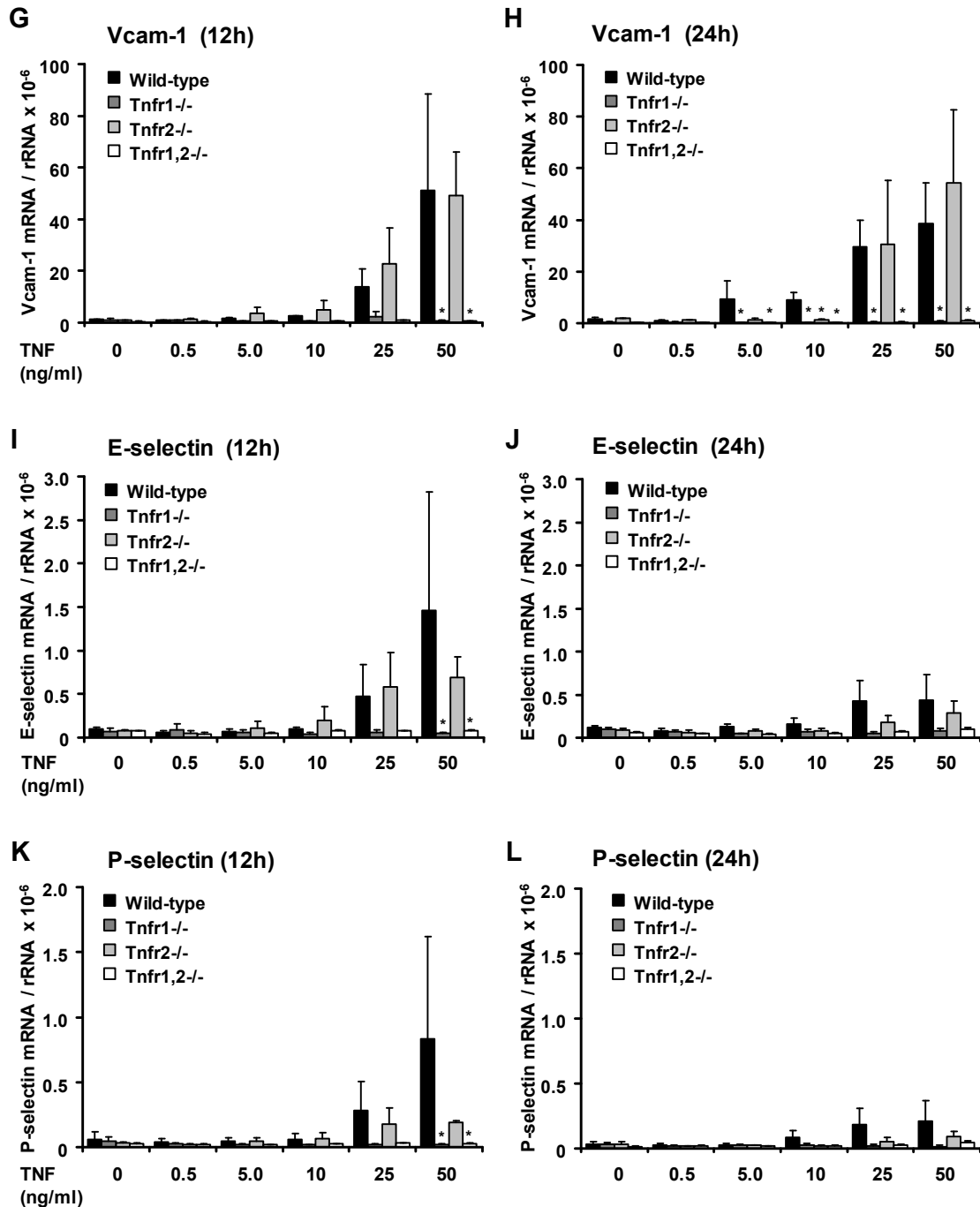


Abbildung 34: Vergleich der Transkriptionsprofile der Chemokine und Adhäsionsmoleküle nach einer 12- und 24-stündigen TNF-Stimulation.

Die cDNA wurde aus Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli nach 12- und 24-stündiger *in vitro* Stimulation mit 0,5, 5, 10, 25 und 50 ng/ml TNF gewonnen und analysiert. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden aus zwei bis (Zeitpunkt 12 Stunden) und drei bis vier (Zeitpunkt 24 Stunden) unabhängigen Versuchen erhoben. Als Kontrolle diente die cDNA aus unstimulierten Glomeruli (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10⁶ multipliziert. *p<0,05 versus mit gleicher TNF-Konzentration stimuliertem Wildtyp.

4.11 Proteinexpression von Tnfr1-abhängig exprimierten Entzündungsmediatoren in Glomeruli

Aus der *Microarray*-Analyse ging hervor, dass die glomeruläre Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine auf transkriptioneller Ebene nach einer TNF-Exposition (12h, 50 ng/ml) überwiegend durch Tnfr1 reguliert wurde. Auch mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Analyse wurde dies für die Chemokine Ccl2/Mcp-1 und Ccl5/Rantes bestätigt.

Im folgenden Versuch wurde die rezeptorabhängige Regulation dieser beiden Chemokine und zusätzlich des Chemokins Cxcl10/Ip-10 auf Protein-Ebene untersucht (Abbildung 35, A-C). Dabei wurde mit Hilfe von ELISA in vier Überständen von stimulierten Glomeruli aus dem vorangegangenen *Microarray*-Experiment (12h, 50 ng/ml TNF) die Protein-Konzentration für den jeweiligen Entzündungsmediator bestimmt. Abbildung 35 stellt die gemessene Protein-Expression für die Chemokine Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes und Cxcl10/Ip-10 in den Überständen aus den vier Genotypen Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} dar. Eine Ccl2-Protein-Expression wurde nur in Wildtyp- und signifikant vermindert in Tnfr2^{-/-} Überständen gemessen (Abbildung 35, A). In Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Überständen blieb diese dagegen aus. Folglich konnte übereinstimmend sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene die Tnfr1-abhängige Ccl2-Expression in Glomeruli bestätigt werden. Dagegen wurden zwei unterschiedliche Tnfr2-abhängige Effekte auf die Ccl2-Expression in Glomeruli beobachtet. Während sich bei gleicher Konzentration in Tnfr2^{-/-} Glomeruli eine zu Wildtyp vergleichbare Ccl2-mRNA-Expression ergab, war diese auf Proteinebene signifikant vermindert. Damit scheint Tnfr2 die Ccl2-Expression auf mRNA-Ebene kaum zu beeinflussen, während durch posttranskriptionelle Regulation Tnfr2 auf Proteinebene zu einer verstärkten Ccl2-Expression beiträgt.

Für Ccl5 und Cxcl10 wurden auf Proteinebene dieselben Expressionsmuster wie bei Ccl2 ermittelt (Abbildung 35, B-C). Beide Chemokine wurden Tnfr1-abhängig exprimiert, aber auch in Abwesenheit von Tnfr2 signifikant vermindert gebildet. Somit konnte auch für Ccl5 und Cxcl10 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene die Tnfr1-abhängige Expression in Glomeruli bestätigt werden. Des Weiteren trägt Tnfr2 auf Protein-Ebene auch bei diesen beiden Chemokinen zu einer vermehrten Expression bei.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse neben der essentiellen Rolle von Tnfr1 auf Protein-Ebene einen offenbar posttranskriptionell vermittelten Tnfr2-Effekt auf, der in TNF-stimulierten Glomeruli zur Bildung proinflammatorischer Chemokine beiträgt.

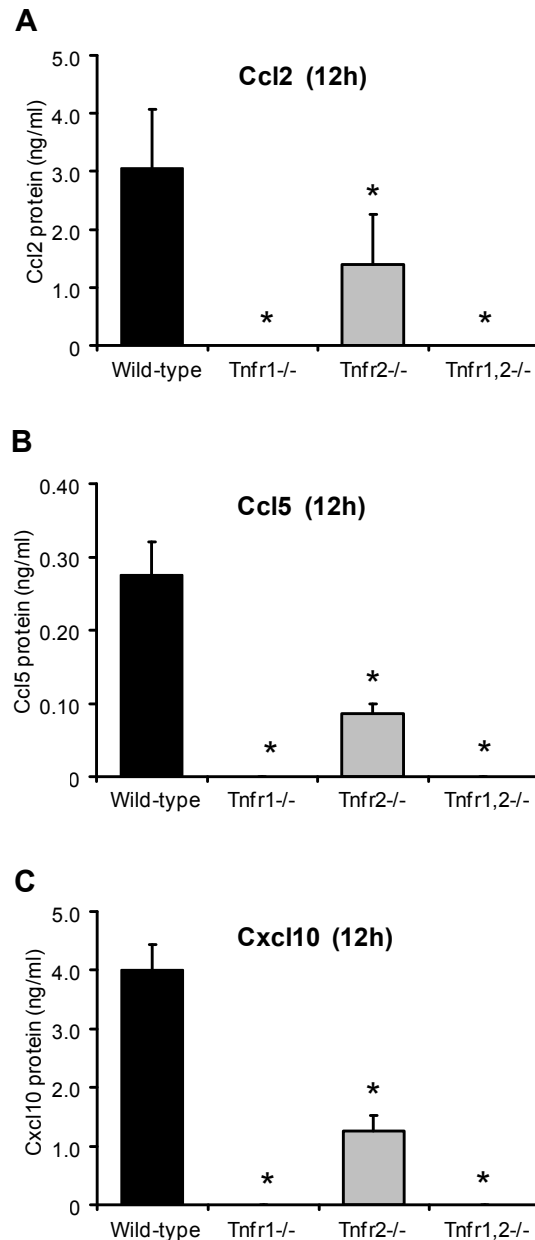


Abbildung 35: Tnfr-abhängige Regulation der Chemokine Ccl2/Mcp-1 (A), Ccl5/Rantes (B) und Cxcl10/lp-10 (C) auf Protein-Ebene in TNF-stimulierten Glomeruli.

Die Proteinexpression wurde mit Hilfe von ELISA in Kulturüberständen von Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} stimulierten Glomeruli aus dem vorangegangenen *Microarray*-Experiment (12h, 50 ng/ml TNF) bestimmt. Die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen erhoben. Als statistische Vergleichswerte dienten die Wildtyp-Überstände. * p<0,05 versus Wildtyp.

4.12 Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen

Die vorangegangenen Analysen zeigten die Tnfr-abhängigen Expressionsmuster von Entzündungsmediatoren in TNF-stimulierten Glomeruli. Dabei wurden die Glomeruli in ihrer Gesamtstruktur betrachtet, an deren Aufbau jedoch mindestens drei Zelltypen beteiligt sind: Endothelzellen, Podozyten und Mesangialzellen (Abschnitt 2.2). In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in den glomerulären Mesangialzellen untersucht. Hierzu wurden diese zunächst charakterisiert und anschließend nach TNF-Stimulation einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen.

4.12.1 Charakterisierung der primären Mesangialzellen

Aus paramagnetisch isolierten Glomeruli der vier Mausstämme (Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-}, Tnfr1,2^{-/-}) wurden primäre Mesangialzellen gewonnen (Abschnitt 3.2.1.7). Da gegenwärtig kein spezieller glomerulärer Mesangialzell-Marker verfügbar ist, erfolgte die Charakterisierung der Zellen durch Ein- und Ausschlusskriterien sowohl mikroskopisch als auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz. Hierfür wurden die Zellen ab der 6. Passage aufgrund ihrer charakteristischen Zytoplasmafortsätze charakterisiert (Abbildung 36, A). Dabei zeichnen sich *in vitro* kultivierte Mesangialzellen durch ein sternförmiges adhärentes Wachstum mit spindelförmigen Ausläufern und der Tendenz, in Aggregaten zu wachsen, aus [134]. Als visuelle negative Kontrolle diente hierfür die murine Endothelzelllinie mit typischer Kopfsteinpflaster-Konfiguration, die sich eindeutig von der Morphologie der Mesangialzellen abgrenzen lässt.

Die Charakterisierung der Mesangialzellen erfolgte ergänzend durch Immunfluoreszenz-Färbung für α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) und Desmin (Abbildung 36, B-C). Mesangialzellen enthalten sowohl α -SMA, ein Bestandteil glatter Muskelzellen, als auch das Intermediärfilament Desmin [134]. Endothelzell-spezifische Antikörper gegen Pcam-1/Cd31 färbten nicht und stellten eine negative Kontrolle dar (Abbildung 36, D).

Die isolierten Mesangialzellen waren in der Immunfluoreszenz-Färbung ebenfalls negativ für Endothelzell-Marker von-Willebrand-Faktor (vWF, Abbildung 36, E) und Zytokeratin 18 (Abbildung 36, F).

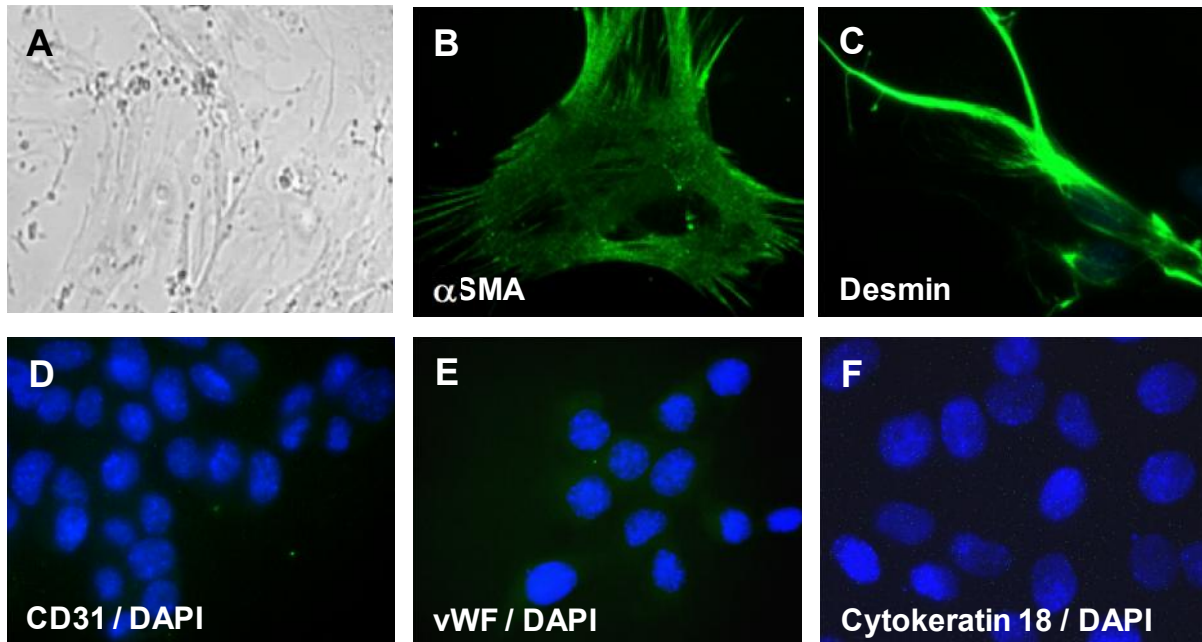


Abbildung 36: Charakterisierung der primären glomerulären Mesangialzellen.

Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen isolierter primärer Mesangialzellen (A), die positive Immunfluoreszenz-Färbung von α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) (B) und Desmin (C) und die negative Färbung von CD31 (D), von-Willebrand-Faktor (vWF) (E) und Zytokeratin 18 (F). Die sekundären Antikörper waren FITC-gekoppelt und die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Originale Vergrößerung x630.

4.12.2 Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in primären Mesangialzellen

Im folgenden Experiment wurde die mRNA-Expression von Tnfr1 und Tnfr2 in isolierten primären Mesangialzellen aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Dazu wurden diese in Zellkultur aufgenommen. Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreien Medium wurden sie für 12 Stunden mit 50 ng/ml TNF *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR unterzogen. Als Kontrolle diente cDNA aus unstimulierten Zellen.

Die in Abbildung 37 dargestellten Ergebnisse zeigen eine konstitutive Tnfr1- und Tnfr2-mRNA-Expression in unstimulierten Mesangialzellen. Des Weiteren fiel auf, dass das Tnfr1-mRNA-Expressionsniveau um etwa das 7-fache höher war als das von Tnfr2.

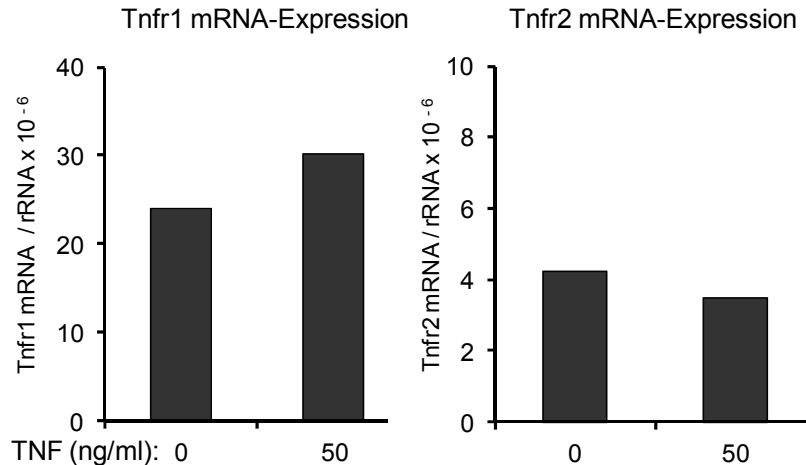


Abbildung 37: Tnfr1- und Tnfr2-Expression in primären Mesangialzellen.

Die primären Mesangialzellen wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert, in Zellkultur aufgenommen und für 12 Stunden mit 50 ng/ml TNF stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR unterzogen. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle diente cDNA aus unstimulierten Zellen (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^6 multipliziert.

4.12.3 Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen

Mit Hilfe der *Microarray*-Analyse konnte gezeigt werden, dass unter anderem die mRNA-Expression der Chemokine Ccl2/Mcp-1 und Ccl5/Rantes sowie der Adhäsionsmoleküle Icam-1 und Vcam-1 in Glomeruli nach einer TNF-Stimulation mit 50 ng/ml für 12 Stunden Tnfr1-abhängig induziert wurde. Diese Ergebnisse waren durch quantitativen RT-PCR und ELISA auf mRNA- und Protein-Ebene bestätigt worden.

Um die mRNA-Expression dieser Chemokine und Adhäsionsmoleküle auch in glomerulären Mesangialzellen unter den oben genannten Bedingungen zu untersuchen, wurden diese Zellen aus vier Mausstämmen (Wildtyp, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-}, Tnfr1,2^{-/-}) isoliert und *in vitro* kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation in serumfreien Medium für 12 Stunden mit aufsteigender TNF-Konzentration bis zu 100 ng/ml TNF stimuliert. Aus allen Zellkulturansätzen wurde cDNA gewonnen und einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen. Als Vergleichskontrolle diente hierbei cDNA aus unstimulierten Mesangialzellen (0 ng/ml TNF). Die Expression der analysierten Gene wurde in Mesangialzellen aus Wildtyp-, Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen gemessen.

Die in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Ccl2-Expression nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation mit 50 ng/ml im Vergleich zu unstimulierten Zellen nur in Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Mesangialzellen um das 83-fache beziehungsweise 81-fache zunahm. In beiden Genotypen wird Tnfr1 exprimiert. In Abwesenheit von Tnfr1 in Mesangialzellen aus Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen war dagegen die Expression vergleichbar mit der in unstimulierten Zellen. Somit konnte die Tnfr1-abhängige Ccl2-mRNA-Expression auch in primären Mesangialzellen bestätigt werden. Zusammenfassend entsprach in TNF-stimulierten Mesangialzellen das Ccl2-Expressionsmuster dem der mit gleicher TNF-Konzentration (50 ng/ml) stimulierten Glomeruli (Abbildung 38, A).

Die Ccl5-Expression stieg ebenfalls im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle nur in Mesangialzellen von Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Mäusen in Anwesenheit von Tnfr1 an, nach Stimulation mit 50 ng/ml um das 31-fache beziehungsweise um das 65-fache an (Abbildung 38, B). In Mesangialzellen von Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen, also in Abwesenheit von Tnfr1, blieb diese Expressionssteigerung dagegen aus. Somit konnte auch eine Tnfr1-abhängige Ccl5-mRNA-Expression in den Mesangialzellen bestätigt werden.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von Icam-1 und Vcam-1 untersucht. Aus Abbildung 38, C geht hervor, dass die Icam-1-Expression nach einer 12-stündigen TNF-Stimulation von Mesangialzellen nur in Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Zellen zunahm, bei einer Stimulation mit 50 ng/ml um das 21-fache beziehungsweise um das 74-fache. Im Gegensatz dazu war in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-}-Zellen keine deutliche Zunahme der Expression festzustellen. Somit konnte die Tnfr1-abhängige Icam-1-Expression auch in den Mesangialzellen bestätigt werden (Abbildung 38, C).

Ein entsprechendes Expressionsmuster wurde auch für Vcam-1 in Mesangialzellen beobachtet (Abbildung 38, D). Dabei stieg die Vcam-1-Expression in Zellen von Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Mäusen nach 50 ng/ml TNF um das 69-fache beziehungsweise um das 113-fache an, während in Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mesangialzellen eine Expressionssteigerung ausblieb. Somit konnte die Tnfr1-abhängige Vcam-1-mRNA-Expression auch in den Mesangialzellen bestätigt werden.

Ferner wurde auch die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin (Abbildung 38, E) und P-Selektin (Abbildung 38, F) zu dem bereits genannten Zeitpunkt (12h) analysiert.

Die in Abbildung 38, E-F dargestellten Ergebnisse zeigen keine signifikante Expression von E-Selektin und P-Selektin in diesen Zellen unter den genannten Bedingungen.

Die in Gesamtglomeruli nachgewiesenen Expressionssteigerungen nach TNF-Stimulation sind daher offenbar vor allem durch Endothelzellen (oder auch Podozyten) vermittelt.

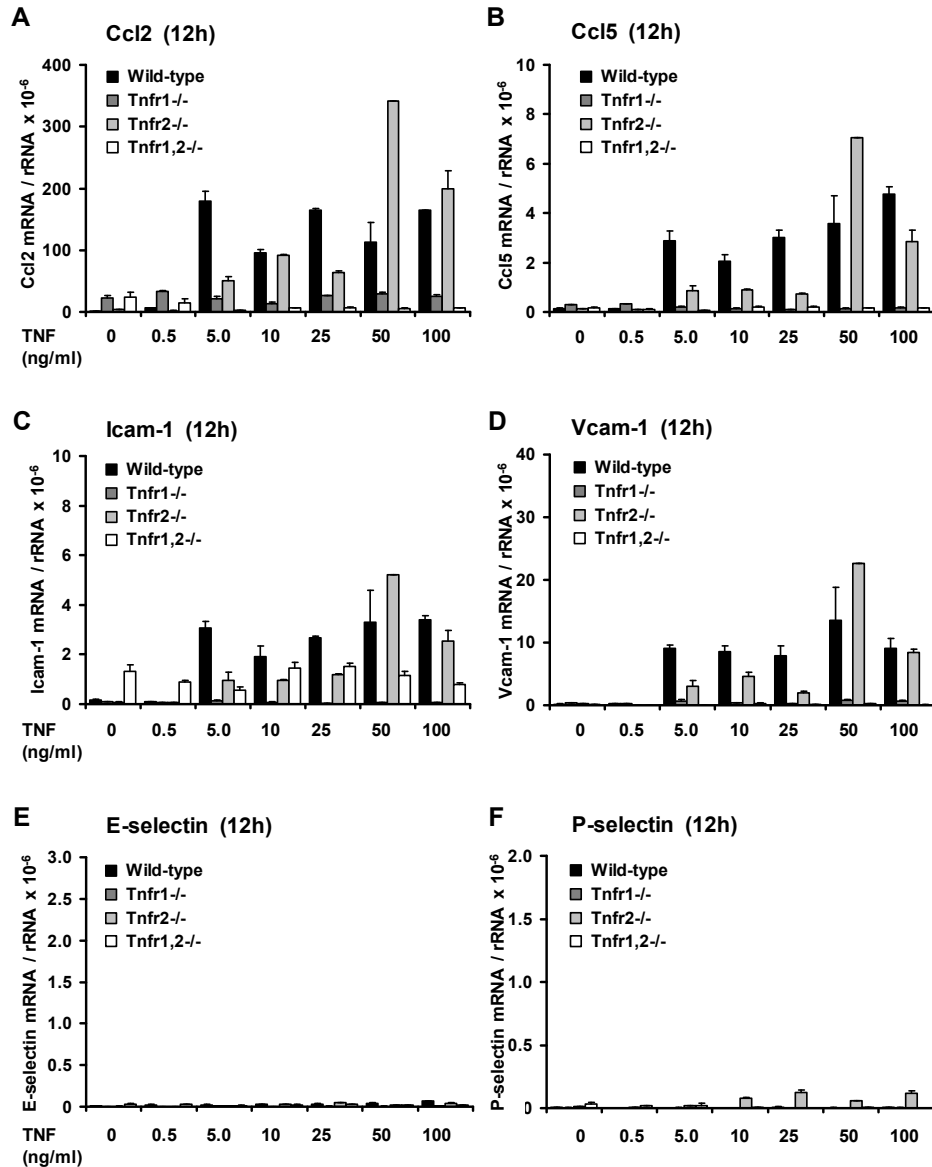


Abbildung 38: Expression von Chemokinen (A-B) und Zelladhäsionsmolekülen (C-F) in primären Mesangialzellen.

Die primären Mesangialzellen wurden aus acht Wochen alten Wildtyp, Tnfr1-/-, Tnfr2-/- und Tnfr1,2-/- C57BL/6J-Mäusen isoliert, *in vitro* kultiviert und für 12 Stunden mit 50 ng/ml TNF stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und einer quantitativen RT-PCR unterzogen. Die Mittelwerte wurden aus zwei unabhängigen Versuchen erhoben. Als Kontrolle diente cDNA aus unstimulierten Zellen (0 ng/ml TNF). Die mRNA-Konzentrationen wurden auf die endogene ribosomale RNA-Kontrolle normalisiert (mRNA/rRNA). Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte mit dem Faktor 10^6 multipliziert.

4.13 Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis

Eine ausgeprägte Lupusnephritis tritt im genetischen Hintergrund des MRL/lpr-Mausstammes auf. Zur Untersuchung der Rolle der TNF-Rezeptoren bei Lupusnephritis wurde daher eine Rückkreuzung der Tnfr-defizienten C57BL/6J-Mäuse mit MRL/lpr-Mäusen bis zur N6-Generation durchgeführt (Abschnitt 3.2.7.3). Dabei nähert sich der gesamte genetische Hintergrund der Tnfr-defizienten Mäuse zunehmend dem des Zielstammes (MRL/lpr) an, während die Rezeptordefizienz erhalten bleibt. In der N6-Generation befanden sich die Mäuse zu >99% im MRL/lpr-Hintergrund. Anschließend wurde der spontane Krankheitsverlauf in den so generierten Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen untersucht.

Im Zeitrahmen dieser Doktorarbeit konnten bis zur N6-Generation die drei Mausstämme Wildtyp, Tnfr1^{-/-} und Tnfr2^{-/-} MRL/lpr-Mäuse (Tabelle 13) generiert werden. Bei diesen wurde anschließend die Krankheitsentwicklung von der 6. bis zur 24. Lebenswoche beobachtet. Dabei wurden ausschließlich weibliche Mäuse untersucht. In der 24. Woche erfolgte die Organentnahme von Nieren, Lunge, Milz und Lymphknoten zur weiteren Analyse. Leukozytenpopulationen der Milz und renale Leukozyteninfiltrate wurden durchflusszytometrisch untersucht. In den Wochen 6, 8, 12, 16, 20 und 24 wurden das Gewicht und der Allgemeinzustand (Lymphknotenschwellungen und Gelenkstatus) der Mäuse bestimmt sowie Urinabnahmen vorgenommen. In der Woche 24 erfolgte zum Zeitpunkt der Organentnahme eine Blutabnahme zur Gewinnung von Serum für die Analyse von Serumparametern (Albumin, Cholesterin, Kreatinin und Harnstoff). Über den Gesamtzeitraum wurde auch die Überlebensrate bestimmt.

Tabelle 13: Rückkreuzung Tnfr-defizienter Mäuse im MRL/lpr-Hintergrund.

Die Generierung der Mausstämmen erfolgte zeitgleich. Dabei verlief diese für Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäuse im Vergleich zu den anderen beiden Mausstämmen erheblich langsamer und beanspruchte mehr als 24 Monate. Die Generierung der Tnfr1,2-/- MRL/lpr-Mäuse konnte nicht im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit erfolgen. Somit standen zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Doktorarbeit 22 Wt-MRL/lpr (Kontrollmäuse), 27 Tnfr1-/- MRL/lpr- und 11 Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäuse aus der N6-Generation für die Analyse zur Verfügung.

Mausstamm	Wt-MRL/lpr	Tnfr1-/- MRL/lpr	Tnfr2-/- MRL/lpr
Anzahl der Mäuse (N6-Generation, 24. Woche)	22	27	11

4.13.1 Bestimmung der Überlebensrate

Im Zeitraum zwischen der 6. und 24. Lebenswoche wurde die Überlebensrate der Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse mit der der Kontrollmäuse (Wt-MRL/lpr) verglichen. Während Wildtyp und Tnfr1-/- MRL/lpr-Mäuse bis Woche 24 nur eine geringe Mortalität aufwiesen, war diese in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 39).

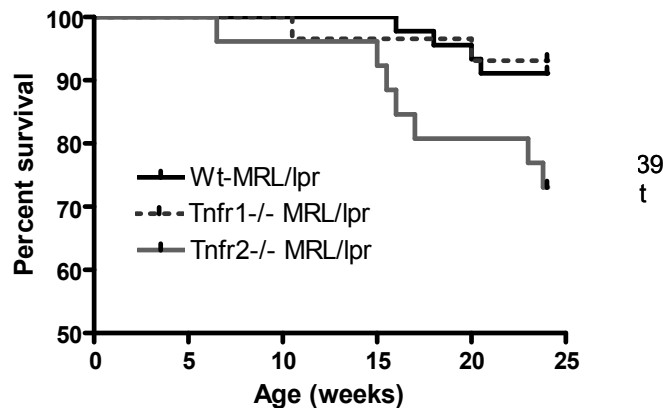


Abbildung 39: Mortalität in Wildtyp-, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen.

Dargestellt ist die Überlebensrate der Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse und der Kontrollmäuse (Wt-MRL/lpr) im Zeitraum zwischen der 6. und 24. Lebenswoche. N=11 bis 27 Mäuse pro Gruppe.

4.13.2 Gewicht

Über den beobachteten Zeitraum wurde auch das Körpergewicht der Mäuse gemessen. Der Verlauf in den drei Versuchsgruppen ist in Abbildung 40 dargestellt. Zu Versuchsbeginn (6. Lebenswoche) wogen die Mäuse im Durchschnitt 25 g. Im weiteren Verlauf war in allen drei Gruppen bis zur 20. Lebenswoche eine stetige Gewichtszunahme zu verzeichnen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum war das Gewicht der Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäuse vergleichbar zu den Kontrollmäusen.

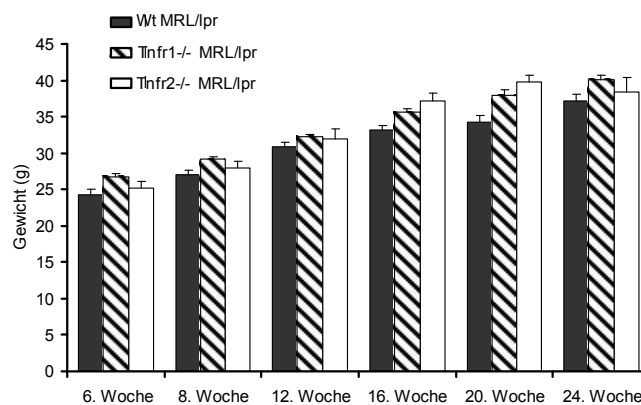


Abbildung 40: Gewichtsverlauf in Wildtyp, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen.

Der Untersuchungszeitraum begann mit der 6. Lebenswoche und endete mit der 24. Lebenswoche der Mäuse. N=11 bis 27 Mäuse pro Gruppe.

4.13.3 Serumchemie

Das Serum der analysierten Mausstämmen wurde in der 24. Lebenswoche gewonnen und analysiert. Funktionell wurden die Serumparameter Kreatinin und Harnstoff als Marker der Nierenfunktion und Gesamteiweiß und Cholesterin als Marker eines möglichen nephrotischen Syndroms bestimmt. In den serologischen Untersuchungen zu Woche 24 fand sich ein signifikant höherer Harnstoffwert in den Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen, bei vergleichbaren Serumwerten für Kreatinin, Gesamteiweiß und Cholesterin (Abbildung 41).

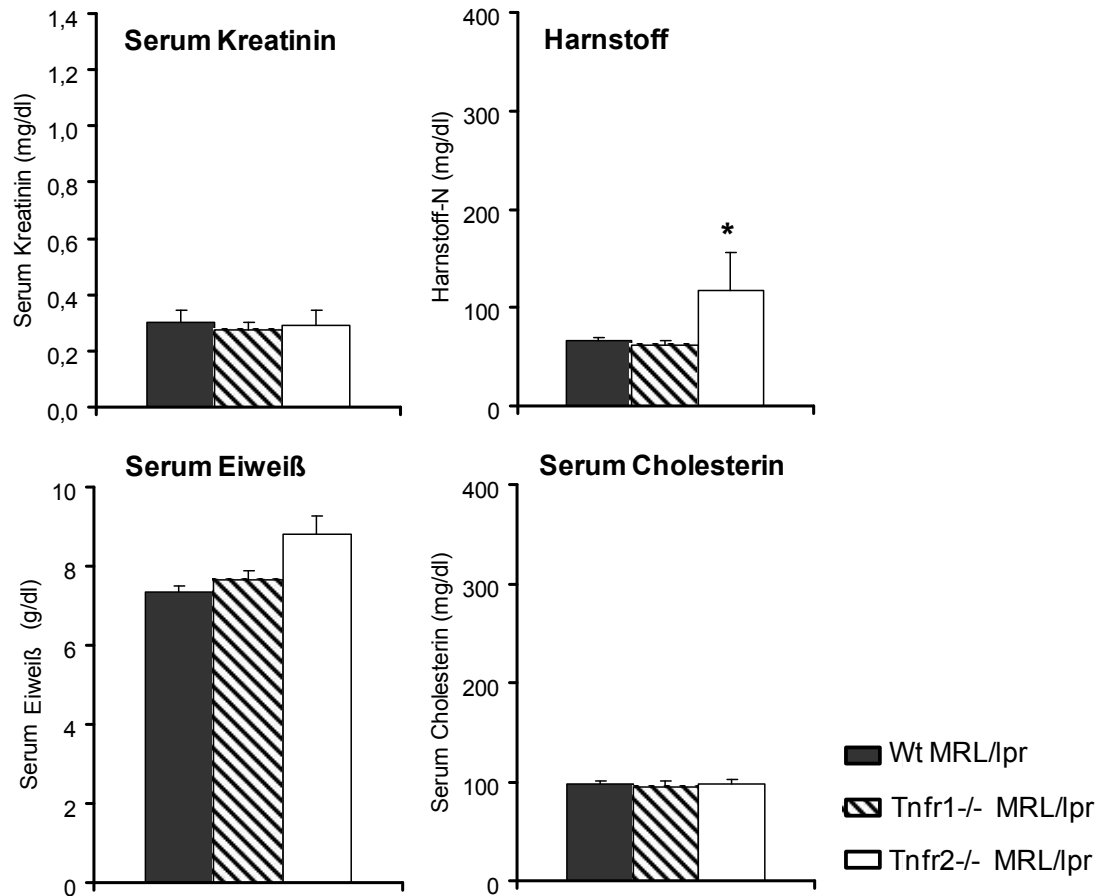


Abbildung 41: Parameter der Serumchemie in Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen in der 24. Lebenswoche.

Je Versuchsgruppe (Wildtyp, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäuse) wurden zwischen N=11 bis 27 Mäuse analysiert. * p<0,05 versus Wildtyp.

4.13.4 Albuminurie

Die Albuminurie wurde aus Urin der 24 Wochen alten Mäuse bestimmt und ist in Abbildung 42 dargestellt. In der Kontroll-Gruppe wurden im Mittel $0,9 \pm 0,5$ mg Albumin/mg Kreatinin im Urin gemessen. Die Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine signifikante Albuminausscheidung auf (Abbildung 42).

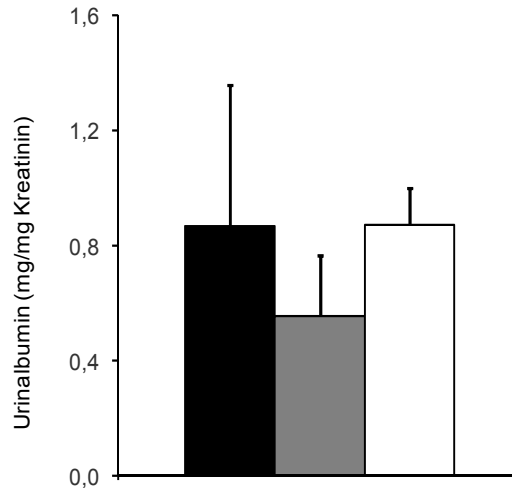


Abbildung 42: Albuminurie in Wildtyp, Tnfr1^{-/-} und Tnfr2^{-/-} MRL/lpr-Mäusen.

Das Urinalbumin/Kreatinin-Verhältnis wurde von Mäusen in der 24. Lebenswoche bestimmt. Je Versuchsgruppe wurden zwischen N=11 bis 27 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit SEM.

4.13.5 Veränderungen in der Milz von Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen

Klinisch wird das Krankheitsbild der MRL/lpr-Mäuse von massiver Lymphoproliferation und Glomerulonephritis bestimmt. Die Lymphoproliferation zeigt sich in einer Vergrößerung der Lymphknoten und einer Splenomegalie. Durch die Bestimmung des Gewichts von Milz, zervikalen Lymphknoten und der Zellzahl in der Milz wurde untersucht (Abbildung 43), ob die Abwesenheit von TNF-Rezeptoren in diesem Mausmodell in der 24. Lebenswoche zu einer Veränderung der Splenomegalie und der Lymphoproliferation führte.

Das Milzgewicht (Abbildung 43, A) war in den drei Genotypen nicht signifikant unterschiedlich, allerdings zeigte sich in den Tnfr2^{-/-} Mäusen, nicht jedoch in Tnfr1^{-/-} Mäusen eine deutlich stärkere Lymphadenopathie (Abbildung 43, B) als in den Wildtyp-Kontrollen.

Aus der durchflusszytometrischen Bestimmung der Zellzahl in der Milz (Abbildung 43, C) ging hervor, dass diese im Vergleich zur Kontrolle in Tnfr1^{-/-} und Tnfr2^{-/-} MRL/lpr-Mäusen um das 1,3-fache beziehungsweise um das 2,2-fache zunahm. Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p=0,4$ bzw. $p=0,081$).

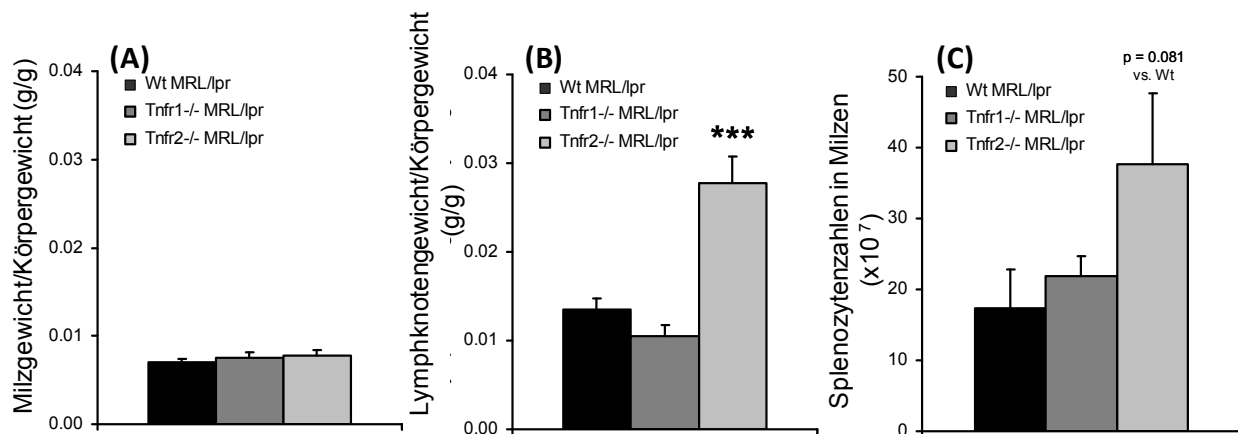


Abbildung 43: Milz- (A) und Lymphknotengewicht (B) und Splenozytenzahlen in Milz (C) von Wildtyp,

Milz- (A) und Lymphknotengewicht (B) und Splenozytenzahlen in Milz (C) von Wildtyp, Tnfr1-/- und Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen der 24. Lebenswoche. N=11 bis 27 Mäuse pro Gruppe. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit SEM. *** p<0,001 versus Wildtyp.

Des Weiteren wurde die Anzahl einzelner Leukozytenpopulationen in der Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abbildung 44 stellt die gemessenen absoluten Zellzahlen dieser Populationen dar. Die Anzahl der CD3⁺-T-Zellen betrug in Milzen von Wildtyp-MRL/lpr-Kontrollmäusen im Mittel $7,4 \pm 3 \times 10^6$, in Tnfr1-/- MRL/lpr- $7,7 \pm 1,3 \times 10^6$ und in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen $14,0 \pm 4,1 \times 10^6$. Trotz der 1,9 fachen Erhöhung der CD3⁺-T-Zellen in den Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen ergab sich in der statistischen Analyse hierfür jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollmäusen.

Die Auswertung der CD4⁺-T-Zellen ergab eine Anzahl von $2,8 \pm 0,9 \times 10^6$ in Wildtyp, $3,7 \pm 0,5 \times 10^6$ in Tnfr1-/- und $5,1 \pm 1,5 \times 10^6$ in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen. Auch hier wurde keine statistische Signifikanz zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt.

Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Anstieg der CD8⁺-T-Zellen um das 2,5-fache in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen ($3,3 \pm 0,8 \times 10^6$, p<0,05), nicht jedoch in Tnfr1-/- MRL/lpr-Mäusen ($1,5 \pm 0,3 \times 10^6$) im Vergleich zum Wildtyp ($1,3 \pm 0,3 \times 10^6$) beobachtet.

Die autoinflammatorischen CD3⁺CD4⁻CD8⁻-T-Zellen waren in den drei Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Interessanterweise nahm die Anzahl der CD4⁺ CD25⁺-T-Zellen sowohl in Tnfr1-/- ($1,3 \pm 0,3 \times 10^6$, p<0,05) als auch in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen ($1,6 \pm 0,4 \times 10^6$, p<0,05) im Vergleich zu den Kontrollmäusen ($0,5 \pm 0,2 \times 10^6$) zu.

Die Anzahl der B220⁺-B-Zellen war in den drei Genotypen vergleichbar.

Schließlich ergab die Analyse der CD11c⁺-dendritischen Zellen keine statistische Signifikanz bei den Vergleichsgruppen.

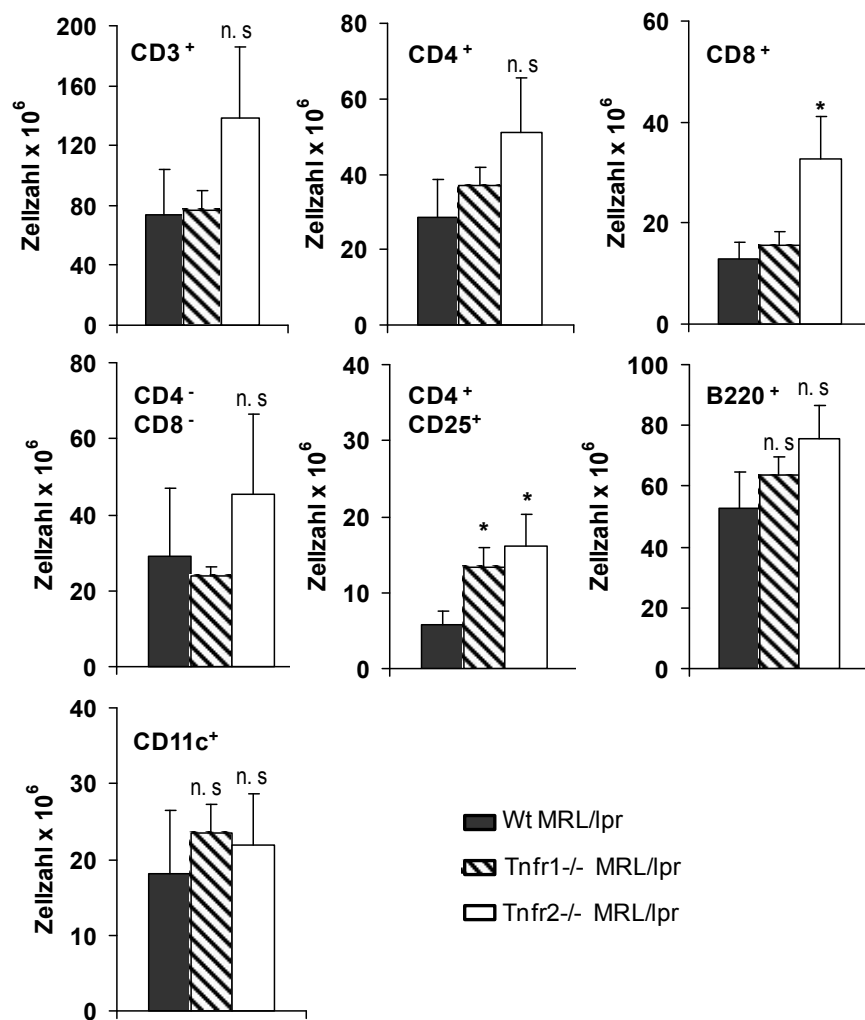


Abbildung 44: Leukozytenpopulationen in der Milz der MRL/lpr-Tnfr-defizienten Mäuse.

Dargestellt wurden die absoluten Zahlen der CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD3⁺CD4⁺CD8⁻-, CD4⁺CD25⁺-, B220⁺-, CD11c⁺- und CD11c⁺CD40⁺-Zellen in der Milz von Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen in 24. Lebenswoche. Für die statistische Auswertung dienten Wildtyp-MRL/lpr-Mäuse als Vergleichskontrolle. Pro Versuchsgruppe wurden zwischen N=6 und 13 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. n.s nicht signifikant. * p<0,05 versus Wildtyp.

4.13.6 Nachweis renaler Leukozyteninfiltration

Um die renale Leukozyteninfiltration in 24 Wochen alten Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen mittels Durchflusszytometrie quantifizieren zu können, wurde eine Einzelzellsuspension aus Nierengewebe der Mäuse gewonnen. Anschließend erfolgte eine Oberflächenfärbung der Nierenzellen gegen die Oberflächenmarker für CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD11c⁺ und F4/80⁺, die nach Antikörperfärbung unmittelbar durchflusszytometrisch analysiert wurde (Abbildung 45).

Die Anzahl der infiltrierenden Leukozyten wurde in Relation zur Gesamtzahl aller Nierenzellen dargestellt. In der FACS-Analyse wurden dafür zunächst die CD45⁺-Zellen markiert, um das gesamte Leukozyteninfiltrat zu quantifizieren. In Tnfr1^{-/-} Mäusen fand sich eine signifikant verstärkte renale Infiltration von CD3⁺-T-Zellen. Dieser lag eine vermehrte Akkumulation von CD4⁺-T-Zellen, nicht jedoch von CD8⁺-T-Zellen zugrunde (Abbildung 45). Interessanterweise trat in den Tnfr2^{-/-} MRL/lpr-Mäusen eine 3,7-fach verstärkte renale Akkumulation von CD4⁺CD8⁻-T-Zellen auf. Diese Zellpopulation korreliert im MRL/lpr-Modell mit autoimmuner Aktivität. Die Infiltration F4/80⁺ mononukleärer Phagozyten und CD11c⁺ dendritischer Zellen unterschied sich in den drei Genotypen nicht signifikant.

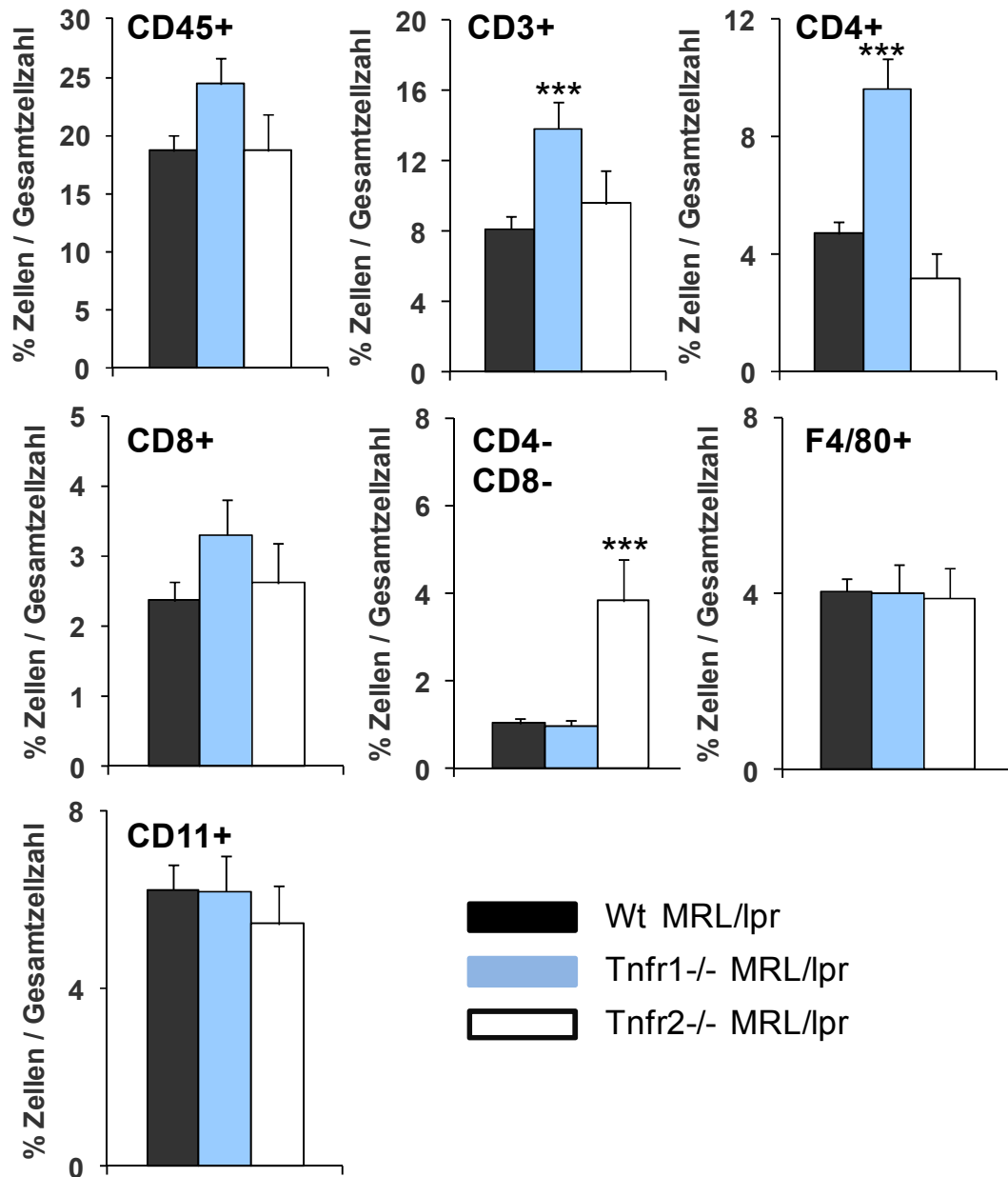


Abbildung 45: Renale Leukozyteninfiltration bei Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen.

Dargestellt sind die prozentuellen Anteile an CD45⁺-, CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD3⁺CD4⁻CD8⁻-, F4/80⁺- und CD11c⁺-Zellen in der Niere von Tnfr-defizienten MRL/lpr-Mäusen der 24. Lebenswoche. Wildtyp-MRL/lpr-Mäuse dienen als Vergleichskontrolle. Pro Versuchsgruppe wurden zwischen N=11 und 27 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen. *** p<0,001 versus Wildtyp.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von TNF/TNF-Rezeptoren bei der Glomerulonephritis

Eine immunologische, methabolische oder toxische Schädigung der Nierenglomeruli führt zu ihrer Entzündung (Glomerulonephritis) oder Vernarbung (Glomerulosklerose). Die glomeruläre Ablagerung von Immunkomplexen und Komplementfaktoren induziert eine Immunkomplex-Glomerulonephritis, ein länger bestehender Diabetes melitus beispielsweise eine noduläre Glomerulosklerose. Die glomeruläre Entzündungsreaktion und Fibrosierung wird hierbei initial durch die Aktivierung glomerulärer Zellen (Mesangialzellen, Endothelzellen und Podozyten) ausgelöst. Abhängig von Art und Ort der Schädigung bilden diese Zellen Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Zytokine, die eine lokale Infiltration von Leukozyten vermitteln [135]. Dies setzt eine glomeruläre Entzündungsreaktion in Gang, die einerseits zur direkten Schädigung der Glomeruli führt, andererseits erreichen die durch aktivierte glomeruläre Zellen und infiltrierende Leukozyten gebildeten proinflammatorischen Mediatoren über das nachgeschaltete Kapillarnetzwerk und den Primärharn das Tubulointerstitium. Dort tragen sie zur Entwicklung einer sekundären tubulointerstitiellen Nephritis und Fibrose bei.

TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen pathophysiologische Rolle auch bei der glomerulären Entzündung aufgezeigt wurde. Es vermittelt unter anderem die inflammatorische Aktivierung des Gefäßendothels mit verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, dies ermöglicht die nachfolgende Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen [136] [137] [138] [139]. Tierexperimentelle Studien im Modell der Lupusnephritis zeigen, dass TNF im Gegensatz zu anderen Zytokinen zu einem ähnlich frühen Zeitpunkt wie die renalen Chemokine exprimiert wird und seine Bildung damit der Leukozyteninfiltration und renalen Gewebeschädigung voraus geht [30].

Allerdings vermittelt TNF neben seiner klassischen proinflammatorischen Funktion auch wichtige immunsuppressive Effekte, die Entzündungen begrenzen und Autoimmunreaktionen verhindern können [89]. Diese gegensätzlichen TNF-Effekte wurden klinisch an Patienten mit rheumatoider Arthritis oder entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt, die unter TNF-blockierenden Therapien lupusartige Krankheitsbilder und sogar Glomerulonephritiden entwickeln können [89] [141] [142]. Weitere tierexperimentelle Studien weisen daraufhin, dass die proinflammatorische und immunsuppressive Funktionen von TNF unterschiedlich durch die beiden TNF-Rezeptoren Tnfr1 und Tnfr2 vermittelt werden [89] [143] [144].

Obwohl TNF auch in vitro als klassisches Agens verwendet wird, um Endothel- und Mesangialzellen zu aktivieren, wurden interessanterweise bisher nur wenige Daten über TNF-Rezeptor-spezifische zelluläre Effekte publiziert [145] [146]. Die Vorarbeiten aus unserer Gruppe identifizierten Tnfr2 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis als essentiellen Mediator der Immunkomplex-Glomerulonephritis [103]. Dabei war die Expression von Tnfr2 in renalen Parenchymzellen, nicht jedoch in infiltrierenden Leukozyten für die Ausbildung der Nephritis erforderlich. Immunhistologisch konnte auch eine Tnfr2-Expression in glomerulären Endothelzellen und möglicherweise im Mesangium nachgewiesen werden [103]. Aus der Arbeit ging hervor, dass Tnfr2-defiziente Knockoutmäuse im Vergleich zu nephritischen Wildtyp-Mäusen keine Proteinurie, keine glomeruläre und sekundär interstitielle Leukozyteninfiltration und keine renale Gewebeschädigung entwickelten. Im Gegensatz dazu zeigten Tnfr1-defiziente Mäuse nur in der frühen Phase der Nephritis einen abgeschwächten Krankheitsverlauf, der mit Verminderung der für die Induktion der Nephritis erforderlichen systemischen Immunantwort einherging. Zu späteren Zeitpunkten entwickelten Tnfr1-defiziente Tiere dagegen eine Wildtypmäusen vergleichbare Nephritis. Gleichzeitig trat eine exzessive Akkumulation renaler T-Zellen auf, die mit einer reduzierten Apoptoserate dieser Zellen korrelierte. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde eine funktionelle Rolle von TNF bei der Apoptose aktivierter T-Zellen beschrieben, die eine Terminierung (auto-)immunologischer Reaktionen ermöglicht [82]. Basierend auf den Vorarbeiten liegt der vorliegenden Arbeit die Hypothese zugrunde, dass Tnfr1 und Tnfr2 unterschiedliche TNF-Effekte in Glomeruli vermitteln.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, Expression und Funktion der beiden TNF-Rezeptoren in Maus-Glomeruli zu charakterisieren und insbesondere Tnfr-abhängig exprimierte Entzündungsmediatoren in Maus-Glomeruli zu identifizieren. Hierfür wurden die Mechanismen der TNF/Tnfr-vermittelten glomerulären Entzündungsreaktion *in vivo*, an isolierten Glomeruli *ex vivo* und an isolierten primären glomerulären Mesangialzellen *in vitro* untersucht.

Zudem wurden in dieser Arbeit erste Phänotypanalysen zur funktionellen Rolle der beiden TNF-Rezeptoren im MRL/lpr-Mausmodell der Lupusnephritis durchgeführt. Hierfür war eine Rückkreuzung von Tnfr1- und Tnfr2-defizienten C57BL/6J-Mäusen in den MRL/lpr-Hintergrund erforderlich.

5.2 Tnfr-Expression in gesunden Glomeruli und glomerulären Zelllinien

In der Literatur wird beschrieben, dass beide TNF-Rezeptoren auch renal unterschiedliche Regulations- und Expressionsmuster aufweisen [33]. Laut Al-Lamki et al. [147] wird Tnfr1 in der gesunden humanen Niere hauptsächlich in Glomeruli exprimiert [147], während Tnfr2 normalerweise nicht in gesunden humanen Nieren exprimiert wird. Allerdings wurde dennoch eine schwache Tnfr2-Expression in isolierten glomerulären Zellen aus gesunden Nierenbiopsien gezeigt [147].

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit (Kapitel 4.2) weisen in der gesunden Mausniere sowohl eine konstitutive glomeruläre Tnfr1- als auch eine 30-fach niedrigere Tnfr2-mRNA-Expression auf. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde auch auf Proteinebene eine ausgeprägte glomeruläre und nur schwache tubulointerstitielle Tnfr1- und Tnfr2-Proteinexpression beobachtet. Folglich zeigen diese Daten, dass Tnfr1 und Tnfr2 in gesunden humanen und Mausnieren konstitutiv in Glomeruli exprimiert werden, sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene. Dabei ist die Tnfr1-Expression stärker ausgeprägt als die von Tnfr2.

Bezüglich der Lokalisation der beiden TNF-Rezeptoren in Glomeruli wurde schon früher gezeigt, dass humanes TNFR1 im Endothelium von gesunden Glomeruli exprimiert wird [147]. Arbeiten von Vielhauer et al [103] zeigten, dass die Tnfr2-Expression bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis wie der nephrotoxischen Serumnephritis in glomerulären Endothel- und möglicherweise Mesangialzellen erfolgte. Die vorhergehenden Ergebnisse (Kapitel 4.3) weisen eine konstitutive Expression von sowohl Tnfr1 als auch Tnfr2 in immortalisierten murinen glomerulären Endothel- und Mesangialzellen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (als Rezeptoroberflächenexpression) nach.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die unterschiedliche Regulation beider Rezeptoren in Abhängigkeit der Aktivierungsart der Zellen (TNF oder IFN- γ) und der untersuchten glomerulären Zelltypen hin. Im Hinblick auf die inflammatorische Aktivierung wurde die Tnfr1-mRNA-Expression nur durch IFN- γ (glomeruläre Endothelzellen) oder eine kombinierte TNF/IFN- γ -Stimulation (Endothel- und Mesangialzellen) induziert, während Tnfr2 in beiden Zelltypen sowohl durch Einwirkung von TNF als auch IFN- γ vermehrt exprimiert wurde. Eine kombinierte TNF/IFN- γ -Stimulation führte zu stärksten Tnfr2-mRNA-Expression. Zusammengefasst zeigen diese Daten eine im Vergleich zu Tnfr1 niedrige konstitutive mRNA-Expression von Tnfr2 in glomerulären Endothel- und Mesangialzellen, die jedoch durch inflammatorische Stimuli deutlicher als die Tnfr1-Expression induzierbar ist. Auch TNF selbst induziert Tnfr2 im Sinne einer positiven Verstärkung.

Im Bezug auf die Oberflächenexpression beider Rezeptoren wurden ebenfalls zelltypspezifische Expressionsmuster beobachtet. In der glomerulären Endothelzelllinie fand sich eine verminderte Tnfr1- und Tnfr2-Oberflächenexpression nach einer Stimulation der Zellen durch TNF und IFN- γ , während in Mesangialzellen die Tnfr1-Oberflächenexpression unverändert blieb und die Tnfr2-Expression durch eine kombinierte TNF/IFN- γ -Stimulation anstieg. Unsere Ergebnisse zu den murinen Endothelzelllinien werden teilweise durch Studien in humanen Endothelzellen untermauert, die Tnfr1 auf der Zelloberfläche lokalisierten, wobei allerdings die größte Menge an Tnfr1 intrazellulär im trans-Golgie-Netzwerk gefunden wurde [148] [149].

Die spezifische Funktion der Golgi-Lokalisation von Tnfr1 ist noch ungeklärt, jedoch könnte diese Lokalisation als Reservoir für den Plasmamembran-Tnfr1-Pool dienen, welcher nach Bindung seines Liganden TNF durch „*Shedding*“ von der Zelloberfläche abgelöst oder internalisiert werden kann [148]. Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten, dass nach inflammatorischer Stimulation insbesondere in glomerulären Endothelzellen, nicht jedoch in Mesangialzellen die Oberflächenexpression beider TNF-Rezeptoren abnimmt. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus sein, der eine TNF-induzierte Entzündungsreaktion im Glomerulus begrenzt.

5.3 TNF induziert die glomeruläre Expression von Entzündungsmediatoren *in vivo*

Eine wichtige Funktion von TNF besteht in der Vermittlung einer inflammatorischen Aktivierung des Gefäßendothels mit verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, wodurch die nachfolgende Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen ermöglicht wird [136] [137]. So zeigten *in vitro*-Studien von Anders et al. [150], dass proinflammatorische Stimuli wie TNF zu einer gesteigerten Expression von Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes, Cxcl8/Il-8, Cxcl10/lp-10 in intrinsischen renalen Zellen führen [150]. Bei akuten glomerulären oder tubulointerstitiellen Erkrankungen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression dieser Chemokine beobachtet werden [150]. In einer Studie von Neumann et al. [123] wurde gezeigt, dass eine intraperitoneale TNF-Gabe in Wildtyp(C57BL/6J)-Mäusen *in vivo* eine renale Vcam-1- und E-Selektin-Expression induziert und eine Leukozyteninfiltration stimuliert.

Nachdem die bisherigen Ergebnisse eine prominente glomeruläre Expression beider TNF-Rezeptoren und ihre Induktion und Regulation unter inflammatorischen Bedingungen nachgewiesen hatten, sollten im Folgenden Effekte von TNF auf die glomeruläre Expression von Entzündungsmediatoren *in vivo* untersucht werden. Interessanterweise fand sich unter normalen physiologischen Bedingungen (ohne TNF-Stimulation) eine konstitutive mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokine bevorzugt in Glomeruli, bei deutlich niedrigerer Expression im tubulointerstitiellen Gewebekompartiment der gleichen Mausnieren.

Diese Ergebnisse könnten auf den Glomerulus als bevorzugten Ort einer TNF-induzierten inflammatorischen Aktivierung hinweisen.

In dieser Arbeit wurde die glomeruläre mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle Icam-1, Vcam-1, P- und E-Selektin sowie der proinflammatorischen Chemokine Ccl2/Mcp-1, Ccl3/Mip-1 α und Ccl5/Rantes nach intraperitonealer TNF-Gabe (5 μ g TNF i.p., 8h) untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der glomerulären Expression fast aller dieser Mediatoren, mit Ausnahme des T-Zell-rekrutierenden Chemokins Ccl5/Rantes. Die höchste TNF-induzierte mRNA-Expression wurde dabei für Ccl2/Mcp-1 (42,5-fach) gemessen. Zahlreiche publizierte Studien zur Rolle von Ccl2/Mcp-1 und seines Rezeptors CCR2 belegen die Bedeutung dieser Moleküle für die Vermittlung der glomerulären Leukozyteninfiltration, insbesondere von Monozyten/Makrophagen [151] [152] [153] [154] [155].

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine konstitutive Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen präferentiell in Maus-Glomeruli vorliegt und diese Mediatoren nach einer systemischen TNF-Gabe in diesem Kompartiment stark induzierbar sind. Folglich könnten hauptsächlich Glomeruli die bevorzugten Orte der TNF-induzierten Leukozyteninfiltration in der Mausniere sein. Das steht im Einklang mit der glomerulären TNF-Rezeptor-Expression und in Übereinstimmung mit der hohen Reaktionsfähigkeit auf TNF *in vivo*.

5.4 Glomeruläre Leukozyten-Infiltration nach systemischer TNF-Stimulation

Durch *in vivo* TNF-Stimulationsversuche an Wildtyp-Mäusen konnte in dieser Arbeit eine glomeruläre Induktion von sowohl proinflammatorischen Chemokinen als auch Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass Glomeruli ein bevorzugter Orte der TNF-induzierten renalen Leukozyteninfiltration sind. Die Ergebnisse der kompartimentspezifischen FACS-Analyse bestätigten diese Annahme. So führte eine intraperitoneale TNF-Exposition (5µg, 8h) in Mäusen zu einer deutlichen glomerulären Leukozytenakkumulation von CD45⁺-Leukozyten, Ly6C⁺-Neutrophilen und F4/80⁺-mononukleäre Phagozyten, nicht jedoch von CD3⁺-T-Zellen.

Die ausbleibende glomeruläre T-Zell-Infiltration nach TNF-Stimulation korreliert mit dem Fehlen einer deutlich induzierten Expression des T-Zell rekrutierenden Chemokins Ccl5/Rantes in diesem Kompartiment. Allerdings könnte die Infiltration aktiver T-Zellen zu einem anderen als hier in dieser Arbeit untersuchten Stimulationszeitpunkt erfolgen. In ihrer Gesamtheit bestätigen diese Daten das Konzept, dass TNF durch lokale Induktion von Entzündungsmediatoren wie Adhäsionsmolekülen und Chemokinen die glomeruläre Leukozyteninfiltration vermittelt. Dennoch bleiben die Fragen zu beantworten, inwieweit die TNF-induzierte Expression glomerulärer Entzündungsmediatoren durch glomeruläre Zellen oder durch bereits infiltrierte glomeruläre Leukozyten erfolgt und ob diese TNF-Effekte durch Tnfr1 und/oder Tnfr2 in der Mausniere vermittelt werden.

5.5 Tnf-Rezeptor-spezifische inflammatorische Antwort in TNF-stimulierten Glomeruli ex vivo

Um TNF/Tnfr-abhängige Effekte in Maus-Glomeruli unabhängig von infiltrierenden Leukozyten zu charakterisieren, wurde eine cDNA-*Microarray*-Expressionsanalyse an TNF-stimulierten Wildtyp- und Tnfr-defizienten Glomeruli *ex vivo* durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse zusammengefasst und interpretiert.

Die isolierten, intakten Glomeruli wurden *in vitro* mit TNF stimuliert (50 ng/ml, 12h) und die differentiell exprimierten Gene zwischen Wildtyp- versus Tnfr1-/-, Wildtyp- versus Tnfr2-/- und Wildtyp- versus Tnfr1,2-/- Glomeruli verglichen. Der Vergleich zwischen Wildtyp- und Tnfr1,2-/- Glomeruli, in denen bei Fehlen entsprechender Rezeptoren keine TNF-vermittelten Effekte mehr auftreten können, ergab 290 differentiell exprimierte Gene, von denen in Wildtyp-Glomeruli durch die TNF-Stimulation gegenüber Tnfr1,2-/- Glomeruli 219 Gene verstärkt und 71 vermindert exprimiert werden. In dieser Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass TNF in isolierten Wildtyp-Glomeruli eine Überexpression zahlreicher Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine und Zytokinrezeptoren, angeborene Immuneffektoren und Rezeptoren, NF- κ B-assoziierte Moleküle, Proteasen, Apoptose-Regulatoren, antigenpräsentierende Proteine und verschiedenen Signalmoleküle induziert. Diese Moleküle sind wichtige Mediatoren der Leukozyteninfiltration und ihre Rolle wurde in der Entwicklung glomerulärer Erkrankungen in zahlreichen experimentellen Studien gezeigt [156] [157]. Insbesondere zeigen die vorliegenden Ergebnisse einen starken TNF-vermittelten, glomerulären Anstieg von Ccl2/Mcp-1, einem wichtigen Chemokin für Monozyten/Makrophagen, auf. Außer Ccl2/Mcp-1 wurden weitere Chemokine wie Ccl5/Rantes, Ccl7 und Ccl9 in TNF-stimulierten Wildtyp-, jedoch nicht in Tnfr-defizienten Glomeruli identifiziert. Zudem wurde die glomeruläre Expression vieler Neutrophilen-spezifischer Chemokine, wie zum Beispiel Cxcl2, Cxcl3 und Cxcl5 durch TNF induziert.

Dieser glomeruläre Anstieg der Chemokinenexpression stimmt mit den vorhergehenden *in vivo* Ergebnissen überein, die eine Akkumulation von sowohl mononukleären Phagozyten (einschließlich Makrophagen) als auch Neutrophilen in Glomeruli von intraperitoneal TNF-injizierten Mäusen nachweisen.

Zu weiteren funktionellen Gruppen von TNF-induzierten Genen in Wildtyp-Glomeruli zählt ein Spektrum von angeborenen Immuneffektoren, einschließlich einiger Komplementkomponenten (C2, C3, Cfb), die wichtige Mediatoren der Immunkomplex-Glomerulonephritis und anderer entzündlicher Nierenerkrankungen sind [158]. Ebenso wurde ein weiterer Immuneffektor, Serum-Amyloid A3, in TNF-stimulierten Wildtyp-Glomeruli exprimiert. Seine Expression wurde kürzlich in aktivierten Adipozyten beschrieben, in welchen es die Monozyten-Chemotaxis erleichtert [159]. Folglich könnte die glomeruläre Expression von Serum-Amyloid A3 zur Einwanderung glomerulärer Makrophagen nach einer TNF-Stimulation beitragen. Zudem fanden sich einige Matrix-Metalloproteinasen (Mmp3, Mmp9, Mmp13), welche ebenfalls in TNF-stimulierten Wildtyp-Glomeruli stark exprimiert waren. Diese Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Leukozyten-Extravasation und sind in die Pathogenese von entzündlichen Nierenerkrankungen impliziert [160] [161]. Die TNF-Stimulation von Wildtyp-Glomeruli führte im Vergleich zu *Tnfr1,2/-* Glomeruli auch zur vermehrten Expression von Apoptose-Mediatoren, was mit der bekannten Rolle von TNF, in Zielzellen Apoptose auszulösen, übereinstimmt. Des Weiteren induzierte die TNF-Stimulation die Expression zahlreicher Mitglieder der NF- κ B-Familie in Wildtyp-Glomeruli im Gegensatz zu *Tnfr1,2/-* Glomeruli. Auch zahlreiche andere Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren wurden unterschiedlich in Wildtyp- und *Tnfr1,2/-* Glomeruli exprimiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass TNF in Glomeruli die Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren induziert, welche für eine örtliche Leukozyteninfiltration und Leukozytenaktivierung von Bedeutung sind. Die Relevanz der erhobenen Daten aus dieser Arbeit wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die glomeruläre Leukozytenakkumulation einen entscheidenden Schritt in der Pathogenese der Glomerulonephritis und progressiven Niereninsuffizienz darstellt [31].

Die Leukozytenakkumulation tritt bei vielen renalen Erkrankungen bereits vor dem Sichtbarwerden histologischer Schädigungen auf und weist eine signifikante Korrelation mit interstitieller Fibrose und dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung auf. Eine Reduktion des leukozytären Infiltrats führt zur Verlangsamung der Progression der terminalen Niereninsuffizienz und damit zur Verbesserung der Prognose der Krankheit [31].

Da TNF-Effekte über Tnfr1 und/oder Tnfr2 vermittelt werden, wurde die Expression der TNF-induzierten Entzündungsmediatoren in den weiteren Untersuchungen in Abhängigkeit des jeweiligen Rezeptors analysiert. Hierdurch konnten spezifisch Tnfr1- und Tnfr2-vermittelte entzündliche Effekte in Glomerulus identifiziert werden, mit dem Ziel eines verbesserten Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge im Verlauf einer Glomerulonephritis in Bezug auf beide TNF-Rezeptoren. Dies ist auch die Voraussetzung zur Entwicklung spezifischer therapeutischer Strategien für eine entzündliche TNF-Blockade im Glomerulus.

5.5.1 Tnfr1-abhängig regulierte Gene in TNF-stimulierten Glomeruli

Ein Großteil der biologischen TNF-Effekte, wie die Apoptoseinduktion oder die proinflammatorische Aktivierung von NF- κ B wird einer Tnfr1-Aktivierung zugeschrieben. Dies lässt sich teilweise dadurch erklären, dass lösliches TNF eine etwa 20-fach höhere Affinität zu Tnfr1 als zu Tnfr2 besitzt [163]. Auch Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine dominierende Rolle des Tnfr1-Signalwegs in der TNF-vermittelten Induktion von Entzündungsmediatoren in Glomeruli hin.

Der Vergleich der TNF-induzierten Genexpression zwischen Wildtyp- und Tnfr1^{-/-} Glomeruli ergab 219 Tnfr1-abhängig regulierte Gene, die vergleichbare Genexpressionsmuster wie in Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli aufwiesen, aber unterschiedlich zu jenen in Tnfr2^{-/-} Glomeruli waren. Von diesen 219 Tnfr1 regulierten Genen waren in Abwesenheit von Tnfr1 159 vermindert und 60 verstärkt exprimiert.

Bei den vermindert exprimierten Genen handelt es sich unter anderem um eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Zytokinen und Zytokinrezeptoren, angeborenen Immuneffektoren und Rezeptoren, NF- κ B-Faktoren, Proteasen, Apoptose-Regulatoren, antigenpräsentierende Proteine und Signalmoleküle. Die Tnfr1-abhängige Expression einiger Adhäsionsmoleküle und Chemokine wurde auch mit Hilfe der RT-PCR verifiziert. Für einige der Tnfr1-abhängig exprimierten Gene aus dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sie in der Pathogenese der Glomerulonephritis eine Rolle spielen und zum Teil Tnfr1-abhängig exprimiert werden. So zeigte Neumann et al. [123] eine renale, endotheliale, Tnfr1-abhängige Expression von Adhäsionsmolekülen wie Vcam-1 und E-Selektin nach einer *in vivo* TNF-Exposition der Mäuse, die zu einer anschließenden Leukozyteninfiltration führte. In der Literatur ist jedoch bisher ein Großteil der in dieser Arbeit identifizierten Gene im Zusammenhang mit Tnfr1 noch nicht beschrieben worden. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig systematisch Tnfr1-abhängig regulierte Gene nach einer TNF-Stimulation im Glomerulus identifiziert werden.

Alle Tnfr1-abhängig regulierten Gene waren gleichsinnig auch in Tnfr1,2-/- Glomeruli reguliert, wobei im direkten Vergleich zwischen Wildtyp und Tnfr1,2-/- Glomeruli nicht für alle Gene eine statistische Signifikanz erreicht wurde (vgl. Tabelle A1). Allerdings weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass weniger Gene in Tnfr1-/- Glomeruli als in Tnfr1,2-/- Glomeruli differentiell exprimiert wurden, so dass eine zusätzliche Rolle von Tnfr2 in Anwesenheit von Tnfr1 bei der Expression dieser Mediatoren angenommen werden muss. Auf diese Tnfr1-abhängige synergistische Wirkung von Tnfr2 weisen auch die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analysen hin. Hier hatte sich eine funktionelle Rolle von Tnfr2 nach prolongierter Induktion proinflammatorischer Chemokine und Adhäsionsmoleküle nach Stimulation mit niedrigen TNF-Konzentrationen gezeigt. Dieser Kooperation zwischen Tnfr1 und Tnfr2 könnte die Bildung von Rezeptorheterokomplexen [164] oder der Prozess des „*ligand passing*“ zu Grunde liegen. In Letzterem erhöht Tnfr2-gebundenes TNF die örtliche TNF-Konzentration in der Nähe von Tnfr1 [50]. Damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal, dass eine TNF-induzierte Expression von zahlreichen Entzündungsmediatoren in murinen Glomeruli *ex vivo* hauptsächlich von einer Tnfr1-Aktivierung abhängig ist und zahlreiche Entzündungsmediatoren von glomerulären Zellen exprimiert werden können.

In einer kürzlich publizierten Studie von Teramoto et al. [178] wurde mittels *Microarray*-Expressionsanalyse zahlreiche induzierte Gene in Glomeruli von MRL/lpr-Mäusen, als Mausmodell der Lupusnephritis gezeigt. Diese Gene umfassen eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren, Komplementkomponenten und zahlreiche weitere Entzündungsmediatoren, die in dieser Arbeit ebenfalls mit Hilfe der *Microarray*-Analyse als Tnfr1-abhängig reguliert in Glomeruli identifiziert wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tnfr1 auch in dem MRL/lpr-Mausmodell für die Expression dieser Entzündungsmediatoren verantwortlich sein könnte.

5.5.2 Tnfr2-abhängig regulierte Gene in TNF-stimulierten Glomeruli

Im Gegensatz zu den zahlreichen Tnfr1-abhängig regulierten glomerulären Genen wurden nur vier ausschließlich Tnfr2-abhängig exprimierte Gene im Vergleich der TNF-induzierten Genexpression zwischen Wildtyp- und Tnfr2^{-/-} Glomeruli identifiziert. Das einzige gut charakterisierte Gen innerhalb dieser Gruppe ist Rab6b, eine kleinmolekulare GTPase. Die kleinmolekulare GTPasen der Rab-Familie spielen beim intrazellulären Transport von Proteinen und Membranvesikeln eine entscheidende Rolle. Über 60 verschiedene humane Rab-GTPasen wurden bisher identifiziert [165]. In ihrer aktivierten, das heißt GTP-gebundenen Form rekrutieren sie Effektormoleküle, die die Membranfusion zwischen Donor- und Akzeptormembran vermitteln und sowohl die Exozytose als auch Endozytose ermöglichen. Dabei sind Rab-Proteine für den vesikulären Transport entlang des Aktin- und mikrotubulären Zytoskeletts erforderlich. Für zahlreiche Rab-Proteine wurde auch eine renale Expression nachgewiesen, so konnten Rab 4, 5A, 7, 11, 13, 18, 20, 25, 34 und 38 in Tubuluszellen nachgewiesen werden [176] [177] während Rab3A in Podozyten und Rab23 in Mesangialzellen exprimiert wird [162] [177]. Eine modifizierte Expression von renalem Rab3A, Rab23 und mutiertem Rab38 wurde auch mit der Entwicklung von sowohl muriner als auch humaner Glomerulosklerose assoziiert [162] [177].

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen interessanterweise eine konstitutiv verminderte Rab6b-Expression in TNF-stimulierten Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli, nicht jedoch in Tnfr1^{-/-} und Wildtyp-Glomeruli auf. Diese Ergebnisse der *Microarray* Analyse konnten auch mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden. Ein technisches Artefakt durch Deletion des Tnfr2-Gens erscheint unwahrscheinlich, da Tnfr2 und Rab6b auf den unterschiedlichen Chromosomen 4 [172] bzw. 3 [173] kodiert werden. Die Funktion von renal exprimiertem Rab6b wurde bislang noch nicht untersucht.

Im Gegensatz zu Tnfr2-abhängig exprimiertem Rab6b wurde ein weiteres Mitglied der Rab-Familie in Glomeruli, allerdings Tnfr1-abhängig, exprimiert, nämlich Rab32, dessen glomeruläre Funktion ebenfalls noch nicht untersucht ist.

Interessanterweise zeigen Tnfr2^{-/-} Glomeruli nach einer TNF-Stimulation nahezu eine 50%ige Reduktion der Proteinsekretion von Chemokinen wie Ccl2/Mcp-1, Ccl5/Rantes und Cxcl10/lp-10 auf, im Gegensatz zu Wildtyp-Glomeruli bei weitgehend erhaltender Expression entsprechender Chemokine auf mRNA-Ebene (*Microarray*- und RT-PCR-Versuch). Die Ergebnisse wären mit einer potentiellen Rolle der Tnfr2-abhängig exprimierten Rab GTPase bei intrazellulärem Transport und Sekretion glomerulärer Entzündungsmediatoren zu vereinbaren. Diese Hypothese wird in geplanten *in vitro* Studien an glomerulären Zellen untersucht werden.

5.6 Tnfr-abhängige Expression von Entzündungsmediatoren in primären Mesangialzellen

Das Mesangium liegt zentral im Glomerulus und spielt durch seine zentrale Lage eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Progression glomerulärer Erkrankungen. Es besteht aus Mesangialzellen [166] [167], die eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren produzieren können und somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese immunvermittelter glomerulärer Erkrankungen einnehmen [168]. Zytokine wie TNF, IL-1 β aber auch LPS führen in diesen Zellen zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 [169] [170] und damit potentiell zu einer vermehrten Interaktion von Leukozyten und Mesangialzellen.

In verschiedenen Arbeiten wurde ebenfalls gezeigt, dass TNF, IL-1 β und IFN- γ eine Expression von Chemokinen wie CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IL-10 und CXCL2/MIP-2 in Mesangialzellen induzieren [170] [171].

Daher wurde in vorliegender Arbeit zusätzlich zu den Analysen an isolierten Glomeruli *ex vivo* die Expression ausgewählter Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1, E- und P-Selektin) und Chemokine (Ccl2, Ccl5) in TNF-induzierten, primären Mesangialzellen untersucht, die aus Wildtyp-, Tnfr1 $^{-/-}$, Tnfr2 $^{-/-}$ und Tnfr1,2 $^{-/-}$ Mäusen isoliert wurden.

Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ähnelten die Expressionsprofile der untersuchten Entzündungsmediatoren stark denen in TNF-stimulierten Glomeruli, was eine wesentliche Rolle von Mesangialzellen im TNF-induzierten, inflammatorischen Prozess in Glomeruli vermuten lässt. Vergleichbar mit Glomeruli war die Expression dieser Mediatoren auch in Mesangialzellen Tnfr1-abhängig. Somit könnte eine TNF-Aktivierung von Mesangialzellen über den Tnfr1-Signalweg zur Freisetzung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen führen, wodurch die Leukozytenmigration in das Glomerulus vermittelt wird, was den Beginn eines glomerulären Schadens charakterisiert.

Interessanterweise konnte keine Expression der Adhäsionsmoleküle wie E- und P-Selektin in diesen Zellen nachgewiesen werden. Da beide Adhäsionsmoleküle nach einer TNF-Induktion in Glomeruli sowohl *in vivo* als auch *in vitro* exprimiert wurden, könnten andere glomeruläre Zelltypen, wie zum Beispiel glomeruläre Endothelzellen für die lokale Expression beider Selektine verantwortlich sein.

5.7 Die Rolle von TNF-Rezeptoren bei muriner Lupusnephritis

Diesen Untersuchungen lag nach Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe [103] zunächst die Hypothese zugrunde, dass in der Pathogenese der Immunkomplex-vermittelten Lupusnephritis ähnlich wie im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis renal exprimierter Tnfr2 essentielle proinflammatorische TNF-Effekte vermittelt. Andererseits wiesen die vorangegangenen Untersuchungen, insbesondere die *Microarray*-Analysen eine führende Funktion von Tnfr1 bei der Induktion glomerulärer Entzündungsmediatoren nach. Um die funktionelle Rolle beiden TNF-Rezeptoren bei der Lupusnephritis zu charakterisieren mussten daher Tnfr1- und Tnfr2-defiziente Mäuse im C57BL/6J-Hintergrund mit Mäusen des MRL/lpr-Stammes, der spontan eine Lupusnephritis entwickelt, rückgekreuzt werden.

In den Tnfr1-/- MRL/lpr-Mäusen konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen kein deutlich veränderter Phänotyp festgestellt werden. Insbesondere ergaben sich keine Hinweise auf einen verbesserten Verlauf der Lupusnephritis bei vergleichbaren funktionellen Parametern (Serumharnstoff, Proteinurie). Allerdings zeigte sich auch keine verstärkte systemische Autoimmunreaktivität oder eine Verschlechterung der Lupusnephritis. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung des renalen Leukozyteninfiltrats ergab sich zwar eine signifikant erhöhte renale Infiltration von CD3⁺T-Lymphozyten, der vor allem eine vermehrte Akkumulation CD4⁺T-Zellen zugrunde lag. Die Zahl renaler autoreaktiver CD4⁺CD8⁻ T-Zellen war jedoch nicht erhöht. Außerdem führte die vermehrte CD4⁺T-Zellinfiltration nicht zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion im Vergleich zu den Wildtyp MRL/lpr-Mäusen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen im nephrotoxischen Serumnephritismodell [103], in dem Tnfr1-Defizienz zu einer anfänglich verzögerten, letztendlich aber zu einer dem Kontrollmäusen vergleichbaren Ausprägung der Nephritis führte.

In den Nieren Tnfr1-defizienter Mäuse fand sich auch in der nephrotoxischen Serumnephritis eine signifikant gesteigerte T-Zellinfiltration, die mit einer verminderten T-Zellapoptose korrelierte [103].

Die von Zhou et al. [143] publizierten Daten über einen verschlechterten Verlauf der Lupusnephritis in Tnfr1-defizienten B6/lpr-Mäusen konnte dagegen in den eigenen Studien mit Tnfr1-defizienten Mäusen im MRL-Hintergrund nicht bestätigt werden. Interessanterweise ergaben sich in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen Hinweise auf eine gesteigerte systemische Autoimmunreaktivität, ohne Anhalt für eine verminderte Aktivität der Lupusnephritis. Hierauf weisen die erhöhte Mortalität, die schwerere Lymphadenopathie und die tendenziell erhöhte Splenozytenzahl mit signifikant vermehrten CD8⁺T-Lymphozyten und vermehrten regulatorischen CD4⁺CD25⁺T-Zellen in Tnfr2-defizienten MRL/lpr-Mäusen hin. Diese verstärkten autoinflammatorischen Eigenschaften gehen in den Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen auch mit einer Verschlechterung der Lupusnephritis einher. Des Weiteren sprechen die erhöhten Serumharnstoffwerte in Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen für eine stärkere Nierenschädigung. Entsprechend zeigt sich in den Tnfr2-/- MRL/lpr-Mäusen durchflusszytometrisch eine deutlich erhöhte renale Infiltration autoreaktiver CD4⁺CD8⁺T-Lymphozyten.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für eine immunsuppressive Funktion von TNF im MRL/lpr-Modell des SLE, die selektiv über Tnfr2 vermittelt wird. Bei der Tnfr2-Defizienz kommt es zu einer verstärkten Autoimmunität mit vermehrter Endorganschädigung in der Niere. Dagegen konnte weder in Tnfr1- noch in Tnfr2-defizienten MRL/lpr-Mäusen eine Verbesserung der Lupusnephritis nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Vorarbeiten im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis [103] scheint zumindest im MRL/lpr-Mausmodell der Lupusnephritis Tnfr2 somit keine entscheidende Funktion für die Entstehung der immunkomplexbedingten glomerulären Schädigung zu besitzen.

Interessanterweise wurde kürzlich eine Studie veröffentlicht, in der Jacob und Mitarbeiter ebenfalls die Rolle der beiden TNF-Rezeptoren im Lupus-Mausmodell untersuchten [174]. Diese Arbeitsgruppe verwendete spontan Lupus-entwickelnde *New Zealand Mixed 2328* (NZM2328)-Mäuse, die mit Tnfr-defizienten Mäusen rückgekreuzt wurden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigten Tnfr1-defiziente NZM2328-Mäuse gegenüber Wildtyp-NZM2328-Mäusen keinen veränderten Phänotyp. Allerdings fanden die Autoren auch in Tnfr2-defizienten NZM2328-Mäusen keine veränderte Pathologie, was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen im MRL/lpr-Modell steht.

In Tnfr1,2-defizienten NZM2328-Mäusen trat dagegen eine deutliche Verschlechterung des Lupus mit exazerbierter Nephritis auf, sodass diese Arbeit die immunsuppressive Rolle des TNF-Systems beim Lupus unterstreicht [174]. Allerdings scheint im MRL/lpr-Modell des Lupus selektiv Tnfr2 immunsuppressive, die Autoimmunität begrenzende Funktionen zu haben, während diese in NZM2328-Mäusen redundant über beide TNF-Rezeptoren vermittelt werden.

Zusammenfassend weisen unsere und die publizierten Daten darauf hin, dass eine TNF-vermittelte glomeruläre Entzündungsreaktion keine entscheidende, zumindest eine redundante Rolle bei Entstehung der Lupusnephritis spielt und entsprechende therapeutische Strategien nicht erfolgversprechend sind. Im Gegenteil scheint insbesondere die Blockade von Tnfr2 mit der Gefahr einer zunehmenden systemischen Autoimmunreaktivität und Verschlechterung des SLE einherzugehen. Letztere Ergebnisse korrelieren gut mit der klinischen Erfahrung, die ein Auftreten von Autoimmunphänomenen bei Patienten unter TNF-blockierenden Therapien beschreibt.

5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend identifizierten die vorliegenden Expressionsstudien verschiedene Klassen von TNF-induzierten Immuneffektoren in intrinsischen glomerulären Zellen, einschließlich Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine, Komponenten des Komplementsystems und Matrix-Metalloproteinasen. Viele dieser entzündlichen Mediatoren sind direkt an der örtlichen Leukozytenrekrutierung und Leukozytenaktivierung beteiligt. Im Einklang damit wurde demonstriert, dass eine relativ kurze *in vivo* TNF-Exposition der Mäuse in einer schnellen, glomerulären Infiltration von Neutrophilen und mononukleären Phagozyten resultiert. Interessanterweise war die TNF-induzierte Expression dieser Mediatoren fast ausschließlich vom Tnfr1-Signalweg abhängig. In Anwesenheit von Tnfr1 trägt Tnfr2 zur inflammatorischen glomerulären Antwort bei, besonders wenn Glomeruli oder Mesangialzellen mit niedrigen TNF-Konzentrationen stimuliert wurden. Zudem weisen die Untersuchungen zur TNF-Rezeptor-abhängigen Sekretion proinflammatorischen Chemokine in TNF-stimulierten Glomeruli auf einen zusätzlichen posttranskriptionellen Effekt von Tnfr2 hin, der ergänzend zur Tnfr1-abhängigen mRNA-Expression dieser Moleküle auftritt. Ob die bei Tnfr2-Defizienz konstitutiv verminderte Expression der Rab6b GTPase zu einer verminderten Chemokinsekretion führt oder andere Tnfr2-abhängige Effekte hier eine Rolle spielen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die zentrale Rolle von Tnfr1 in der Induktion von TNF-abhängigen Entzündungsmediatoren wurde auch durch in der Arbeitsgruppe durchgeführte *in vivo* Studien demonstriert, in welchen die glomeruläre Leukozyteninfiltration in TNF-stimulierten Tnfr1^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Mäusen erheblich vermindert war, während die Akkumulation von Neutrophilen in Tnfr2^{-/-} Mäusen unverändert blieb. Jedoch verminderte die Tnfr2-Defizienz die Akkumulation von mononukleären Phagozyten in Glomeruli, was auf eine nicht-redundante Rolle von Tnfr2 in Anwesenheit von Tnfr1 für die Rekrutierung dieser Leukozytenpopulation hinweist (Schwarz M et al, Manuskript eingereicht).

Dennoch konnten, mit Ausnahme von Rab6b, keine weiteren Tnfr2-abhängig exprimierten Entzündungsmediatoren in Glomeruli identifiziert werden. Eines der Gründe für die wenigen identifizierten, ausschließlich Tnfr2-abhängig exprimierten Gene könnte die Tatsache sein, dass von aktivierten angrenzenden glomerulären Zellen [102] oder infiltrierenden Makrophagen [175] exprimiertes membrangebundenes TNF (memTNF) zur Aktivierung glomerulärer TNF-Rezeptoren *in vivo* führt. Es wird vermutet, dass memTNF bevorzugt Tnfr2 aktiviert [49], während lösliches TNF (sTNF) hauptsächlich Tnfr1 stimuliert [163]. Es bleibt also zu erforschen, ob memTNF tatsächlich bevorzugt glomeruläres Tnfr2 statt Tnfr1 aktiviert. Ist das der Fall, würde die Abwesenheit von Tnfr2 *in vivo* einen stärkeren Einfluss auf die TNF-vermittelten glomerulären Effekte haben als wir es in unseren *in vitro* Studien nach Stimulation mit sTNF feststellen konnten. Membrangebundenes TNF könnte auch ausreichend dafür sein, um inflammatorische Antworten ausschließlich über eine Tnfr2-Aktivierung ohne den Tnfr1-Signalweg bei niedrigen TNF-Konzentration auszulösen. Dieses Szenario würde vorangegangene *in vivo* Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe erklären, welche auf eine wichtige Rolle der glomerulären Tnfr2-Expression, unabhängig von Tnfr1-vermittelten Effekten, in der Entwicklung der IK-GN hinweisen [103]. Derzeit ist der Einfluss von sTNF und memTNF auf die Induktion glomerulärer Entzündungsmediatoren und deren Abhängigkeit vom Tnfr1- oder Tnfr2-Signalweg schwer zu klären. Geeignete zelluläre Transporter, welche Glomeruli *in vitro* oder *in vivo* mit memTNF stimulieren könnten, ohne dabei andere inflammatorische Effektorfunktion (Ausschüttung zusätzlicher Zytokine) hervorzurufen, sind aktuell nicht verfügbar.

Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse, dass der Tnfr1-Signalweg essentiell für inflammatorische Antworten in Glomeruli und Mesangialzellen auf sTNF ist. Tnfr2 trägt offensichtlich zur Tnfr1-vermittelten Induktion von Genen bei niedrigen sTNF Konzentrationen bei und Tnfr2 könnte zusätzlich unbekannte Funktionen in posttranskriptionalen Modifikationen von Tnfr1-abhängig exprimierten Genen haben. Die durch sTNF induzierte, Tnfr1-abhängige inflammatorische Antwort in Glomeruli könnte die verspätete Entwicklung der glomerulären Schädigung in Tnfr1-defizienten Mäusen nach der *in vivo* Induktion der IK-GN erklären [103].

Zudem legen die zahlreichen Tnfr1-abhängig exprimierten glomerulären Entzündungsmediatoren und die deutliche Reduktion insbesondere der glomerulären Infiltration von Neutrophilen in Tnfr1-defizienten Mäusen eine wichtige Rolle von Tnfr1 bei von Neutrophilen vermittelten Glomerulonephritiden nahe. So könnte zum Beispiel die spezifische Blockade von Tnfr1 bei der postinfektiösen Glomerulonephritis eine therapeutische Strategie darstellen.

Dagegen erscheint aufgrund der erhobenen Daten im MRL/lpr-Mausmodell eine Blockade von TNF oder beider Rezeptoren in IK-GNs wie der Lupusnephritis, in der glomeruläre Neutrophileninfiltrate keine entscheidende Rolle spielen, wenig erfolgversprechend. Vielmehr ist von einer immunsuppressiven, die systemische Immunreaktivität beim SLE begrenzende Funktion von Tnfr2 auszugehen.

In Bezug auf Tnfr-spezifische, anti-inflammatorische Therapien weisen die hier präsentierten Ergebnisse somit darauf hin, dass eine selektive Tnfr1-Blockade eine glomeruläre Entzündung mit hauptsächlichlicher Beteiligung von Granulozyten verbessern könnte ohne Inhibierung immunregulatorischer und mikrobiologischen Abwehrfunktionen von TNF, die redundant durch Tnfr2 vermittelt werden könnten.

6 Anhang

In den nachfolgenden Tabellen sind alle differenziell exprimierten Gene aus der *Microarray*-Analyse in TNF-stimulierten Tnfr1^{-/-}, Tnfr2^{-/-} und Tnfr1,2^{-/-} Glomeruli jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Glomeruli dargestellt.

Tabelle A 1: Differenziell exprimierte Gene in TNF-stimulierten Tnfr1^{-/-} Glomeruli.

Die Gene sind entsprechend der Expressionsunterschiede (*fold changes*) zwischen Tnfr1^{-/-} und Wildtyp(Wt)-Glomeruli aufgelistet. Für jedes Gen sind alle identifizierten *Probe Sets* aufgeführt. Mehrfache GeneBank-IDs sind für *Probe Sets* angegeben, welche mehrfache Transkripte eines Gens detektieren. n.s.: nicht signifikant.

Affymetrix probe set ID	GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change versus Wt		
				Tnfr1 ^{-/-}	Tnfr2 ^{-/-}	Tnfr1,2 ^{-/-}
1420380_at	NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-42.9	n.s.	-50.0
1427381_at	XM_127883 XM_905897	Irg1	immunoresponsive gene 1	-38.1	n.s.	-31.7
1417314_at	NM_008198	Cfb	complement factor B	-34.0	n.s.	-35.2
1450826_a_at	NM_011315	Saa3	serum amyloid A 3	-24.7	n.s.	-25.5
1415989_at 1436003_at 1448162_at 1451314_a_at	NM_011693	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	-22.1	n.s.	-23.8
1438148_at	NM_203320	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-19.4	n.s.	-22.4
1434015_at	NM_172659	Slc2a6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	-19.2	n.s.	-27.8
1420591_at	NM_030720	Gpr84	G protein-coupled receptor 84	-19.0	n.s.	-16.6
1449984_at	NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-18.0	n.s.	-24.9
1418392_a_at	NM_018734	Gbp3	guanylate nucleotide binding protein 3	-17.4	n.s.	-20.8
1418930_at	NM_021274	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-15.0	n.s.	-21.0
1448881_at	NM_017370	Hp	haptoglobin	-15.0	n.s.	-13.0
1421228_at	NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-14.7	n.s.	-11.2
1433933_s_at	NM_175316	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-14.3	n.s.	-5.1
1418652_at	NM_008599	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-14.0	n.s.	-5.4
1418240_at 1435906_x_at	NM_010260	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	-13.5	n.s.	-14.4
1438676_at 1447927_at	NM_194336	Mpa2l	macrophage activation 2 like	-10.8	n.s.	-22.8
1421074_at 1421075_s_at	NM_007825	Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	-10.5	n.s.	-6.4

1420330_at 1420331_at	NM_019948	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-10.2	n.s.	-13.2
1424067_at	NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	-9.9	n.s.	-15.4
1419728_at	NM_009141	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-8.3	n.s.	-7.8
1450693_at	NM_019958	Rgs17	regulator of G-protein signaling 17	-8.0	n.s.	-8.6
1419192_at	NM_010215	Il4i1	interleukin 4 induced 1	-6.8	n.s.	-8.6
1430837_a_at 1430838_x_at 1453678_at	NM_013594	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	-6.2	n.s.	-8.9
1425253_a_at	NM_013591	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	-6.1	n.s.	-9.1
1418746_at	NM_001039509 NM_019999	Pnkd	Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	-5.8	n.s.	-10.3
1448632_at	NM_013640	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	-5.7	n.s.	-7.9
1418726_a_at 1424967_x_at	NM_001130174 NM_001130175 NM_001130176 NM_001130177 NM_001130178 NM_001130179 NM_001130180 NM_001130181 NM_001136083 NM_011619	Tnnt2	troponin T2, cardiac	-5.6	n.s.	-5.0
1449498_at 1458297_s_at	NM_010766	Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-5.6	n.s.	-5.0
1424393_s_at 1424392_at	NM_175236	Adhfe1	alcohol dehydrogenase, iron containing1	-5.5	n.s.	-5.5
1450047_at	NM_015819	Hs6st2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	-5.4	n.s.	n.s.
1424254_at	NM_001112715 NM_026820	Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	-5.3	n.s.	-3.7
1418126_at	NM_013653	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-5.2	n.s.	-10.6
1425681_a_at	NM_023043	Prnd	prion protein dublet	-5.1	n.s.	-4.2
1423602_at	NM_009421	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-4.9	n.s.	-4.8
1416382_at 1437939_s_at	NM_009982	Ctsc	cathepsin C	-4.8	n.s.	-5.7
1418847_at 1438841_s_at	NM_009705	Arg2	arginase type II	-4.5	n.s.	-6.4
1423091_a_at 1425942_a_at	NM_023122	Gpm6b	glycoprotein m6b	-4.5	n.s.	-6.7
1423954_at	NM_009778	C3	complement component 3	-4.5	n.s.	-5.2
1431843_a_at 1458299_s_at	NM_008690	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	-4.5	n.s.	-3.9
1437569_at	NM_023438	Tmem132e	transmembrane protein 132E	-4.4	n.s.	-5.6

1420697_at	NM_023044	Slc15a3	solute carrier family 15, member 3	-4.4	n.s.	-8.8
1426850_a_at	NM_011943	Map2k6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	-4.3	n.s.	-6.9
1422962_a_at	NM_010724	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	-4.3	n.s.	-8.0
1439747_at 1449450_at	NM_022415	Ptges	prostaglandin E synthase	-4.3	n.s.	-4.2
1416832_at	NM_026228	Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	-4.1	n.s.	-3.7
1417262_at 1417263_at	NM_011198	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-4.1	n.s.	-3.8
1416298_at	NM_013599	Mmp9	matrix metalloproteinase 9	-4.0	n.s.	-3.6
1422953_at	NM_008039	Fpr2	formyl peptide receptor 2	-3.9	n.s.	-3.4
1417936_at	NM_011338	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-3.9	n.s.	-5.4
1450165_at	NM_011408	Slfn2	schlafen 2	-3.8	n.s.	-5.5
1417292_at	NM_008330	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	-3.8	n.s.	-6.1
1436659_at	NM_019978	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	-3.8	n.s.	n.s.
1460251_at	NM_007987	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-3.7	n.s.	-3.3
1419658_at	NM_010398	C920025E04Rik	RIKEN cDNA C920025E04 gene	-3.7	n.s.	-4.6
1424923_at	NM_009251	Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	-3.7	n.s.	-9.4
1418718_at 1449195_s_at	NM_001029929 NM_023158	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-3.6	n.s.	-6.2
1419132_at	NM_011905	Tlr2	toll-like receptor 2	-3.6	n.s.	-3.8
1436778_at	NM_007807	Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide	-3.5	n.s.	-4.2
1434372_at	XM_908564 XM_888885	AW112010	expressed sequence AW112010	-3.5	n.s.	-3.6
1419529_at	NM_031252	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	-3.5	n.s.	-3.2
1421408_at	NM_030691	Igsf6	immunoglobulin superfamily, member 6	-3.5	n.s.	-3.8
1434510_at	NM_011864	Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	-3.4	n.s.	-3.2
1417193_at 1417194_at 1448610_a_at 1454976_at	NM_013671	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-3.4	n.s.	-4.2
1416625_at	NM_009776	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	-3.4	n.s.	-4.1
1428538_s_at 1437902_s_at	NM_027852	Rarres2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	-3.4	n.s.	-3.6
1422648_at 1436555_at	NM_001044740 NM_007514	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-3.4	n.s.	-3.5

1435596_at	NM_175437	Pion	pigeon homolog (Drosophila)	-3.3	n.s.	-2.8
1419691_at	NM_009921	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide	-3.2	n.s.	-3.3
1418945_at	NM_010809	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	-3.2	n.s.	-4.8
1418981_at	NM_009808	Casp12	caspase 12	-3.2	n.s.	-3.8
1417813_at	NM_019777	Ikbke	inhibitor of kappaB kinase epsilon	-3.1	n.s.	-4.2
1418580_at	NM_023386	Rtp4	receptor transporter protein 4	-3.1	n.s.	-3.5
1427313_at	NM_008967	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)	-3.1	n.s.	-4.0
1424524_at	NM_027878	Dram1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	-3.0	n.s.	-4.0
1448734_at	NM_007752	Cp	ceruloplasmin	-3.0	n.s.	-3.8
1451798_at	NM_031167	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	-3.0	n.s.	-3.2
1443698_at	NM_001037713	Xaf1	XIAP associated factor 1	-2.9	n.s.	-3.0
1417045_at	NM_007544	Bid	BH3 interacting domain death agonist	-2.9	n.s.	-3.1
1417256_at	NM_008607	Mmp13	matrix metalloproteinase 13	-2.9	n.s.	-2.4
1416051_at 1457664_x_at	NM_013484	C2	complement component 2 (within H-2S)	-2.9	n.s.	-3.1
1419202_at	NM_009977	Cst7	cystatin F (leukocystatin)	-2.9	n.s.	-2.9
1424824_at	NM_198014	Slain1	SLAIN motif family, member 1	-2.9	n.s.	n.s.
1455197_at	NM_172612	Rnd1	Rho family GTPase 1	-2.8	n.s.	-3.8
1435512_at	NM_177716	Al836003	expressed sequence Al836003	-2.8	n.s.	n.s.
1449227_at	NM_009890	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	-2.8	n.s.	n.s.
1448201_at	NM_009144	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2	-2.8	n.s.	-3.0
1431055_a_at	NM_028035	Snx10	sorting nexin 10	-2.8	n.s.	-2.5
1420499_at 1429692_s_at	NM_008102	Gch1	GTP cyclohydrolase 1	-2.8	n.s.	-2.9
1437312_at 1443720_s_at	NM_007560	Bmpr1b	bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-2.7	n.s.	-3.4
1427482_a_at	NM_007592	Car8	carbonic anhydrase 8	-2.7	n.s.	n.s.
1451567_a_at	NM_001045481 NM_008328	Ifi203	interferon activated gene 203	-2.7	n.s.	-2.3
1421366_at	NM_001038604 NM_021364	Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	-2.7	n.s.	-2.8
1427689_a_at	NM_021327	Tnfr1	TNFAIP3 interacting protein 1	-2.7	n.s.	-3.4
1425951_a_at	NM_020001	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-2.7	n.s.	-4.1
1437442_at 1449249_at	NM_018764	Pcdh7	protocadherin 7	-2.7	n.s.	n.s.
1426037_a_at	NM_011267	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	-2.7	n.s.	-2.6

1443827_x_at	NM_030565	Fam20c	family with sequence similarity 20, member C	-2.7	n.s.	-2.7
1420413_at	NM_011990	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-2.7	n.s.	-2.7
1442116_at	NM_201367	Gpr176	G protein-coupled receptor 176	-2.6	n.s.	n.s.
1419534_at	NM_138648	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.6	n.s.	-2.5
1422835_at	NM_019697	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	-2.6	n.s.	n.s.
1429796_at 1436066_at 1457690_at	NM_001164268 XM_001001454 XM_001001845 XM_001481028 XM_001481029 XM_894473	Kalm	kalirin, RhoGEF kinase	-2.5	n.s.	-2.7
1451544_at	NM_145391	Tapbpl	TAP binding protein-like	-2.5	n.s.	-3.2
1451564_at	NM_001039530	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	-2.5	n.s.	-3.9
1417822_at	NM_033075	D17H6S56 E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	-2.5	n.s.	-2.4
1448793_a_at	NM_011521	Sdc4	syndecan 4	-2.5	n.s.	n.s.
1417189_at	NM_001029855 NM_011190 NM_011191 XM_886229	Psme2	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	-2.5	n.s.	-2.7
1435208_at	NM_001013371	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)	-2.5	n.s.	-2.4
1416527_at	NM_026405	Rab32	RAB32, member RAS oncogene family	-2.5	n.s.	-2.4
1448550_at	NM_008489	Lbp	lipopolysaccharide binding protein	-2.5	n.s.	-2.5
1433699_at	NM_009397	Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-2.5	n.s.	-3.9
1435349_at	NM_010939	Nrp2	neuropilin 2	-2.4	n.s.	-3.1
1421812_at	NM_009318 NM_001025313	Tapbp	TAP binding protein	-2.4	n.s.	-2.9
1436999_at	NM_001003948	5033414K04Rik	RIKEN cDNA 5033414K04 gene	-2.4	n.s.	n.s.
1436559_a_at	NM_001164177 NM_016883	Psmd10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	-2.4	n.s.	n.s.
1437932_a_at	NM_016674	Cldn1	claudin 1	-2.4	n.s.	n.s.
1426223_at	NM_028341	Ttc39c	tetratricopeptide repeat domain 39C	-2.4	n.s.	-2.5
1455251_at	NM_001033228	Itga1	integrin alpha 1	-2.4	n.s.	-2.3
1417172_at	NM_019949	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	-2.3	n.s.	-2.3
1428767_at	NM_026960	Gsdmd	gasdermin D	-2.3	n.s.	-2.6
1449399_a_at	NM_008361	Il1b	interleukin 1 beta	-2.3	n.s.	-1.7

1450297_at	NM_031168	Il6	interleukin 6	-2.3	n.s.	n.s.
1451474_a_at	NM_001081009	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	-2.2	n.s.	-2.2
1416645_a_at	NM_007423	Afp	alpha fetoprotein	-2.2	n.s.	n.s.
1425669_at 1429284_at	NM_178061	Mobkl2b	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	-2.2	n.s.	-2.2
1416897_at	NM_030253	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	-2.2	n.s.	-2.7
1424613_at	NM_022420	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	-2.2	n.s.	n.s.
1419080_at	NM_010275	Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor	-2.2	n.s.	-2.8
1460415_a_at	NM_011611 NM_170701 NM_170702 NM_170703 NM_170704	Cd40	CD40 antigen	-2.1	n.s.	n.s.
1420360_at	NM_010051	Dkk1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	-2.1	n.s.	-1.9
1416942_at	NM_030711	Erap1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-2.1	n.s.	-1.8
1421236_at 1450173_at	NM_138952	Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	-2.1	n.s.	-2.2
1429527_a_at 1453181_x_at	NM_011636	Plscr1	phospholipid scramblase 1	-2.1	n.s.	-2.4
1440840_at	AK052609	D630004K10Rik	RIKEN cDNA D630004K10 gene	-2.1	n.s.	n.s.
1453004_at	NM_001033167	Slc22a23	solute carrier family 22, member 23	-2.0	n.s.	n.s.
1416295_a_at	NM_013563	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	-2.0	n.s.	-2.9
1454834_at	NM_008687	Nfib	nuclear factor I/B	-2.0	n.s.	-2.4
1435488_at	NM_026788	Mthfd2l	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	-2.0	n.s.	-2.1
1460197_a_at	NM_054098	Steap4	STEAP family member 4	-2.0	n.s.	-2.2
1455358_at	NM_021477 NM_183188	A2bp1	ataxin 2 binding protein 1	-2.0	n.s.	-1.7
1454974_at	NM_008744	Ntn1	netrin 1	-1.9	n.s.	-1.6
1437785_at	NM_175314	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.9	n.s.	-1.8
1441493_at	NM_053204 NM_178085	Erc1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	-1.9	n.s.	n.s.
1455711_at	NM_172442	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-1.8	n.s.	-2.0
1460081_at	NM_018801 NM_173067 NM_173068	Syt7	synaptotagmin VII	-1.8	n.s.	-1.8
1425767_a_at	NM_011382	Six4	sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	-1.8	n.s.	-1.6

1418004_a_at	NM_023056	Tmem176b	transmembrane protein 176B	-1.8	n.s.	n.s.
1426501_a_at	NM_145133	Tifa	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain	-1.8	n.s.	-2.1
1440230_at	NM_001024619	Tsku	tsukushin	-1.8	n.s.	n.s.
1416998_at	NM_021511	Rrs1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)	-1.8	n.s.	-1.7
1429974_at	NM_023814	Tbx18	T-box18	-1.8	n.s.	n.s.
1417786_a_at	NM_026446	Rgs19	regulator of G-protein signaling 19	-1.7	n.s.	n.s.
1437743_at	NM_001005605 NM_009637 NM_178803	Aebp2	AE binding protein 2	-1.7	n.s.	n.s.
1421858_at	NM_009615	Adam17	a disintegrin and metallopeptidase domain 17	-1.7	n.s.	-1.9
1455398_at	NM_133897	Lrrc8c	leucine rich repeat containing 8 family, member C	-1.7	n.s.	n.s.
1460014_at	NM_001033922 NM_172623	Trem14	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4	-1.6	n.s.	-1.8
1428891_at	NM_145562	9130213B05Rik	RIKEN cDNA 9130213B05 gene	-1.6	n.s.	n.s.
1432026_a_at	XM_907983	Herc5	hect domain and RLD 5	-1.6	n.s.	n.s.
1417704_a_at	NM_009707 NM_178754	Arhgap6	Rho GTPase activating protein 6	1.8	n.s.	n.s.
1432667_at	AK008898	2210411G17Rik	RIKEN cDNA 2210411G17 gene	1.8	n.s.	n.s.
1449863_a_at	NM_198854 NM_010056	Dlx5	distal-less homeobox 5	2.0	n.s.	1.8
1434248_at	NM_008856	Prkch	protein kinase C, eta	2.1	n.s.	n.s.
1448831_at	NM_007426	Angpt2	angiopoietin 2	2.1	n.s.	n.s.
1434678_at	NM_134163	Mbnl3	muscleblind-like 3 (Drosophila)	2.1	n.s.	n.s.
1418183_a_at	NM_011180	Pscd1	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1	2.2	n.s.	n.s.
1425518_at	NM_019688	Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2.2	n.s.	2.3
1454795_at	NM_177025	Cobl1	Cobl-like 1	2.2	n.s.	n.s.
1422906_at	NM_011920	Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.2	n.s.	2.5
1424852_at	NM_025282	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2.3	n.s.	2.2
1419447_s_at	NM_019636	Tbc1d1	TBC1 domain family, member 1	2.3	n.s.	n.s.
1416129_at	NM_133753	Errfi1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	2.3	n.s.	2.4
1419758_at	NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.3	n.s.	2.0
1438325_at	NM_007963	Evi1	ecotropic viral integration site 1	2.4	n.s.	2.3

1440888_at	XM_144956 XM_916971	Oxtr	oxytocin receptor	2.5	n.s.	n.s.
1455361_at	NM_178681	Dgkb	diacylglycerol kinase, beta	2.5	n.s.	2.2
1456096_at	NM_176952	6430573F 11Rik	RIKEN cDNA 6430573F11 gene	2.5	n.s.	n.s.
1435697_a_at 1451206_s_at	NM_139200	Pscdbp	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	2.5	n.s.	n.s.
1449396_at	NM_009675	Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	2.5	n.s.	2.9
1445723_at	NM_009658	Plcl1	phospholipase C-like 1	2.6	n.s.	n.s.
1425514_at	NM_001024955 NM_011085	Pik3r1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	2.6	n.s.	n.s.
1416105_at	NM_008710	Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	2.6	n.s.	n.s.
1455050_at	NM_178791	E130203B 14Rik	RIKEN cDNA E130203B14 gene	2.6	n.s.	2.7
1435184_at	NM_001039181 NM_008728	Npr3	natriuretic peptide receptor 3	2.7	n.s.	2.9
1454966_at	NM_001001309	Itga8	integrin alpha 8	2.7	n.s.	1.9
1455056_at	NM_201529 XM_001472577 XM_001480973	Lmo7	LIM domain only 7	2.7	n.s.	n.s.
1435741_at	NM_172263	Pde8b	phosphodiesterase 8B	2.7	n.s.	2.1
1418142_at	NM_008428	Kcnj8	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	2.8	n.s.	n.s.
1417622_at 1448780_at	NM_009194	Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	2.8	n.s.	2.1
1454942_at	NM_022018	Niban	niban protein	2.8	n.s.	3.3
1455521_at	NM_010636	Klf12	Kruppel-like factor 12	2.9	n.s.	n.s.
1442115_at	NM_001039485	Fam38b	family with sequence similarity 38, member B	2.9	n.s.	n.s.
1416164_at	NM_011812	Fbln5	fibulin 5	2.9	n.s.	2.7
1417061_at	NM_016917	Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	3.0	n.s.	n.s.
1418156_at	NM_021342	Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk- related subfamily, gene 4	3.0	n.s.	3.4
1440355_at	NM_175429	Kctd12b	potassium channel tetramerisation domain containing 12b	3.0	n.s.	3.9
1420534_at 1434141_at	NM_021896	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	3.0	n.s.	2.6
1435106_at 1435321_at	NM_001001980	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	3.1	n.s.	2.9
1426622_a_at	XM_128770 XM_898493	Qpct	glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)	3.1	n.s.	3.5
1422824_s_at	NM_007945	Eps8	epidermal growth factor receptor pathway	3.1	n.s.	n.s.

substrate 8						
1416892_s_at 1448509_at	NM_025626	Fam107b	family with sequence similarity 107, member B	3.2	n.s.	2.7
1438651_a_at	NM_011784	Agtr1	angiotensin receptor-like 1	3.3	n.s.	n.s.
1445223_at	XM_001005822	4933430H15Rik	RIKEN cDNA 4933430H15 gene	3.4	n.s.	n.s.
1441065_at	NM_009167	Shc3	Src homology 2 domain-containing transforming protein C3	3.5	n.s.	n.s.
1419248_at	NM_009061	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	3.7	n.s.	n.s.
1455627_at	NM_007739	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1	3.8	n.s.	n.s.
1420838_at 1435196_at	NM_001025074 NM_008745	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	4.0	n.s.	2.9
1429579_at	AK018137	6330407118Rik	RIKEN cDNA 6330407118 gene	4.1	n.s.	4.0
1422084_at	NM_009759	Bmx	BMX non-receptor tyrosine kinase	4.2	n.s.	3.6
1425846_a_at	NM_021371	Caln1	calneuron 1	4.5	n.s.	4.1
1424007_at	NM_145741	Gdf10	growth differentiation factor 10	4.8	n.s.	n.s.
1419405_at	NM_026523	Nmb	neuromedin B	5.0	n.s.	5.1
1433691_at	NM_016854	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	5.3	n.s.	6.0
1435752_s_at	NM_001044720 NM_011511 NM_021041 NM_021042	Abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	5.4	n.s.	3.1
1422454_at	NM_010662	Krt13	keratin 13	5.7	n.s.	6.5
1428662_a_at 1451776_s_at	NM_175606	Hopx	HOP homeobox	5.9	n.s.	5.7
1419302_at 1438886_at	NM_013905	Heyl	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	6.0	n.s.	4.7
1438953_at 1438954_x_at 1449528_at	NM_010216	Figf	C-fos induced growth factor	6.4	n.s.	5.3
1428664_at	NM_011702	Vip	vasoactive intestinal polypeptide	9.5	n.s.	11.2

Tabelle A 2: Differenziell exprimierte Gene in TNF-stimulierten Tnfr2-/- Glomeruli.

Die Gene sind entsprechend der Expressionsunterschiede (*fold changes*) zwischen Tnfr2-/- und Wildtyp(Wt)-Glomeruli aufgelistet. n.s.: nicht signifikant.

Affymetrix probe set ID	GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change versus Wt		
				Tnfr2-/-	Tnfr1-/-	Tnfr1,2-/-
1418099_at	NM_011610	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	-4.9	n.s.	-4.4
1418778_at	NM_025779	Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B	-4.3	n.s.	n.s.
1424784_at	NM_001083918	OTTMUSG 000000106 57	predicted gene, OTTMUSG00000010657	-3.5	n.s.	-3.2
1436574_at	NM_027285	1700029I0 1Rik	RIKEN cDNA 1700029I01 gene	-3.1	n.s.	-3.4
1434914_at	NM_173781	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family	-2.6	n.s.	-3.2

Tabelle A 3: Differenziell exprimierte Gene in TNF-stimulierten Tnfr1,2-/- Glomeruli.

Die Gene sind entsprechend der Expressionsunterschiede (*fold changes*) zwischen Tnfr1,2-/- und Wildtyp(Wt)-Glomeruli aufgelistet. Für jedes Gen sind alle identifizierten *Probe Sets* aufgeführt. Mehrfache GeneBank-IDs sind für *Probe Sets* angegeben, welche mehrfache Transkripte eines Gens detektieren. n.s.: nicht signifikant.

Affymetrix probe set ID	GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change versus Wt		
				Tnfr1,2-/-	Tnfr1-/-	Tnfr2-/-
1420380_at	NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-50.0	-42.9	n.s.
1417314_at	NM_008198	Cfb	complement factor B	-35.2	-34.0	n.s.
1427381_at	XM_127883 XM_905897	Irg1	immunoresponsive gene 1	-31.7	-38.1	n.s.
1434015_at	NM_172659	Slc2a6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	-27.8	-19.2	n.s.
1450826_a_at	NM_011315	Saa3	serum amyloid A 3	-25.5	-24.7	n.s.
1449984_at	NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-24.9	-18.0	n.s.
1415989_at 1436003_at 1448162_at 1451314_a_at	NM_011693	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	-23.8	-22.1	n.s.
1438676_at 1447927_at	NM_194336	Mpa2l	macrophage activation 2 like	-22.8	-10.8	n.s.
1438148_at	NM_203320	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-22.4	-19.4	n.s.
1418930_at	NM_021274	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-21.0	-15.0	n.s.
1418392_a_at	NM_018734	Gbp3	guanylate nucleotide binding protein 3	-20.8	-17.4	n.s.
1420591_at	NM_030720	Gpr84	G protein-coupled receptor 84	-16.6	-19.0	n.s.
1424067_at	NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	-15.4	-9.9	n.s.
1418240_at 1435906_x_at	NM_010260	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	-14.4	-13.5	n.s.

1420330_at 1420331_at	NM_019948	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-13.2	-10.2	n.s.
1448881_at	NM_017370	Hp	haptoglobin	-13.0	-15.0	n.s.
1421228_at	NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-11.2	-14.7	n.s.
1418126_at	NM_013653	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-10.6	-5.2	n.s.
1418746_at	NM_001039509 NM_019999	Pnkd	paroxysmal nonkinesio-genic dyskinesia	-10.3	-5.8	n.s.
1424923_at	NM_009251	Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	-9.4	-3.7	n.s.
1425253_a_at	NM_013591	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	-9.1	-6.1	n.s.
1430837_a_at 1430838_x_at 1453678_at	NM_013594	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	-8.9	-6.2	n.s.
1420697_at	NM_023044	Slc15a3	solute carrier family 15, member 3	-8.8	-4.4	n.s.
1419192_at	NM_010215	Il4i1	interleukin 4 induced 1	-8.6	-6.8	n.s.
1450693_at	NM_019958	Rgs17	regulator of G-protein signaling 17	-8.6	-8.0	n.s.
1422962_a_at	NM_010724	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	-8.0	-4.3	n.s.
1448632_at	NM_013640	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	-7.9	-5.7	n.s.
1419728_at	NM_009141	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-7.8	-8.3	n.s.
1426850_a_at	NM_011943	Map2k6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	-6.9	-4.3	n.s.
1423091_a_at 1425942_a_at	NM_023122	Gpm6b	glycoprotein m6b	-6.7	-4.5	n.s.
1452339_at	NM_001003911	Adamts7	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 7	-6.5	n.s.	n.s.
1418847_at	NM_009705	Arg2	arginase type II	-6.4	-4.5	n.s.
1421074_at 1421075_s_at	NM_007825	Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	-6.4	-10.5	n.s.
1418718_at 1449195_s_at	NM_001029929 NM_023158	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-6.2	-3.6	n.s.
1417292_at	NM_008330	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	-6.1	-3.8	n.s.
1437939_s_at	NM_009982	Ctsc	cathepsin C	-5.7	-4.8	n.s.
1437569_at	NM_023438	Tmem132e	transmembrane protein 132E	-5.6	-4.4	n.s.
1424392_at 1424393_s_at	NM_175236	Adhfe1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	-5.5	-5.5	n.s.
1450165_at	NM_011408	Slfn2	schlafen 2	-5.5	-3.8	n.s.
1418652_at 1456907_at	NM_008599	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-5.4	-14.0	n.s.

1417936_at 1448898_at	NM_011338	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-5.4	-3.9	n.s.
1419212_at	NM_015790	Icosl	icos ligand	-5.4	n.s.	n.s.
1423954_at	NM_009778	C3	complement component 3	-5.2	-4.5	n.s.
1433933_s_at 1454777_at	NM_175316	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-5.1	-14.3	n.s.
1451006_at	NM_011723	Xdh	xanthine dehydrogenase	-5.0	n.s.	n.s.
1418726_a_at 1424967_x_at	NM_001130174 NM_001130175 NM_001130176 NM_001130177 NM_001130178 NM_001130179 NM_001130180 NM_001130181 NM_001136083 NM_011619	Tnnt2	troponin T2, cardiac	-5.0	-5.6	n.s.
1449498_at 1458297_s_at	NM_010766	Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-5.0	-5.6	n.s.
1425294_at	NM_029084	Slamf8	SLAM family member 8	-4.9	n.s.	n.s.
1423602_at	NM_009421	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-4.8	-4.9	n.s.
1418945_at	NM_010809	Mmp3	matrix metalloproteinase 3	-4.8	-3.2	n.s.
1419658_at	NM_010398	C920025E04Rik	RIKEN cDNA C920025E04 gene	-4.6	-3.7	n.s.
1435512_at 1436099_at	NM_177716	Al836003	expressed sequence Al836003	-4.5	-2.8	n.s.
1418099_at	NM_011610	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	-4.4	n.s.	-4.9
1417813_at	NM_019777	Ikbke	inhibitor of kappaB kinase epsilon	-4.2	-3.1	n.s.
1417193_at 1417194_at 1448610_a_at	NM_013671	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-4.2	-3.4	n.s.
1425681_a_at	NM_023043	Prnd	prion protein dublet	-4.2	-5.1	n.s.
1439747_at 1449449_at 1449450_at	NM_022415	Ptges	prostaglandin E synthase	-4.2	-4.3	n.s.
1436778_at 1436779_at	NM_007807	Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide	-4.2	-3.5	n.s.
1419627_s_at 1425951_a_at	NM_020001	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-4.1	-2.7	n.s.
1416625_at	NM_009776	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	-4.1	-3.4	n.s.
1424524_at	NM_027878	Dram1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	-4.0	-3.0	n.s.
1427313_at	NM_008967	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)	-4.0	-3.1	n.s.

1451564_at	NM_001039530	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	-3.9	-2.5	n.s.
1431843_a_at 1458299_s_at	NM_008690	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	-3.9	-4.5	n.s.
1450696_at	NM_013585	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	-3.9	n.s.	n.s.
1433699_at	NM_009397	Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-3.9	-2.5	n.s.
1417495_x_at 1417496_at 1417497_at 1448734_at	NM_007752	Cp	ceruloplasmin	-3.8	-3.0	n.s.
1417263_at	NM_011198	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-3.8	-4.1	n.s.
1419132_at	NM_011905	Tlr2	toll-like receptor 2	-3.8	-3.6	n.s.
1421408_at	NM_030691	Igsf6	immunoglobulin superfamily, member 6	-3.8	-3.5	n.s.
1455197_at	NM_172612	Rnd1	Rho family GTPase 1	-3.8	-2.8	n.s.
1418981_at	NM_009808	Casp12	caspase 12	-3.8	-3.2	n.s.
1416832_at	NM_026228	Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	-3.7	-4.1	n.s.
1424254_at	NM_001112715 NM_026820	Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	-3.7	-5.3	n.s.
1453196_a_at	NM_011854	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	-3.7	n.s.	n.s.
1449591_at	NM_007609	Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-3.7	n.s.	n.s.
1419209_at 1441855_x_at 1457644_s_at	NM_008176	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-3.7	n.s.	n.s.
1448136_at	NM_015744	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-3.7	n.s.	n.s.
1428538_s_at 1437902_s_at	NM_027852	Rarres2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	-3.6	-3.4	n.s.
1434372_at	XM_888885 XM_908564	AW112010	expressed sequence AW112010	-3.6	-3.5	n.s.
1416298_at	NM_013599	Mmp9	matrix metalloproteinase 9	-3.6	-4.0	n.s.
1418580_at	NM_023386	Rtp4	receptor transporter protein 4	-3.5	-3.1	n.s.
1422648_at 1426008_a_at 1436555_at	NM_001044740 NM_007514	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-3.5	-3.4	n.s.
1437312_at	NM_007560	Bmpr1b	bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-3.4	-2.7	n.s.
1427689_a_at	NM_021327	Tnip1	TNFAIP3 interacting protein 1	-3.4	-2.7	n.s.

1448436_a_at	NM_008390	Irf1	interferon regulatory factor 1	-3.4	n.s.	n.s.
1422953_at	NM_008039	Fpr2	formyl peptide receptor 2	-3.4	-3.9	n.s.
1436574_at	NM_027285	1700029I01Rik	RIKEN cDNA 1700029I01 gene	-3.4	n.s.	-3.1
1419691_at	NM_009921	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide	-3.3	-3.2	n.s.
1460251_at	NM_007987	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-3.3	-3.7	n.s.
1421207_at	NM_001039537 NM_008501	Lif	leukemia inhibitory factor	-3.2	n.s.	n.s.
1434510_at	NM_011864	Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	-3.2	-3.4	n.s.
1424784_at	NM_001083918	OTTMUSG00000010657	predicted gene, OTTMUSG00000010657	-3.2	n.s.	-3.5
1451798_at	NM_031167	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	-3.2	-3.0	n.s.
1419529_at	NM_031252	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	-3.2	-3.5	n.s.
1434914_at 1437107_at 1460617_s_at	NM_173781	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family	-3.2	n.s.	-2.6
1451544_at	NM_145391	Tapbpl	TAP binding protein-like	-3.2	-2.5	n.s.
1420804_s_at	NM_010819	Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	-3.2	n.s.	n.s.
1460220_a_at	NM_007778	Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	-3.2	n.s.	n.s.
1429543_at 1453188_at	AK018095 AK078961	6230424C14Rik	RIKEN cDNA 6230424C14 gene	-3.1	n.s.	n.s.
1416051_at 1457664_x_at	NM_013484	C2	complement component 2 (within H-2S)	-3.1	-2.9	n.s.
1417045_at	NM_007544	Bid	BH3 interacting domain death agonist	-3.1	-2.9	n.s.
1426528_at 1435349_at	NM_010939	Nrp2	neuropilin 2	-3.1	-2.4	n.s.
1427691_a_at	NM_010509	Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	-3.1	n.s.	n.s.
1443698_at	NM_001037713	Xaf1	XIAP associated factor 1	-3.0	-2.9	n.s.
1438498_at	NM_001029929	Zmynd15	zinc finger, MYND-type containing 15	-3.0	n.s.	n.s.
1448201_at	NM_009144	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2	-3.0	-2.8	n.s.
1421812_at	NM_001025313 NM_009318	Tapbp	TAP binding protein	-2.9	-2.4	n.s.
1419202_at	NM_009977	Cst7	cystatin F (leukocystatin)	-2.9	-2.9	n.s.
1416295_a_at 1416296_at	NM_013563	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	-2.9	-2.0	n.s.
1427736_a_at	NM_017466	Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	-2.9	n.s.	n.s.
1426784_at	NM_172570	Trim47	tripartite motif-containing 47	-2.9	n.s.	n.s.

1420499_at 1429692_s_at	NM_008102	Gch1	GTP cyclohydrolase 1	-2.9	-2.8	n.s.
1421366_at	NM_021364 NM_001038604	Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	-2.8	-2.7	n.s.
1419080_at	NM_010275	Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor	-2.8	-2.2	n.s.
1435596_at 1440454_at	NM_175437	Pion	pigeon homolog (Drosophila)	-2.8	-3.3	n.s.
1416897_at	NM_030253	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	-2.7	-2.2	n.s.
1420413_at	NM_011990	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-2.7	-2.7	n.s.
1417189_at	NM_001029855 NM_011190 NM_011191 XM_886229	Psme2	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta	-2.7	-2.5	n.s.
1436066_at 1457690_at	NM_001164268 XM_001001454 XM_001001845 XM_001481028 XM_001481029 XM_894473	Kalrn	kalirin, RhoGEF kinase	-2.7	-2.5	n.s.
1417688_at 1443827_x_at	NM_030565	Fam20c	family with sequence similarity 20, member C	-2.7	-2.7	n.s.
1450517_at 1460309_at	NM_009317	Tal2	T-cell acute lymphocytic leukemia 2	-2.6	n.s.	n.s.
1426037_a_at	NM_011267	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	-2.6	-2.7	n.s.
1428767_at	NM_026960	Gsdmd	gasdermin D	-2.6	-2.3	n.s.
1417470_at	NM_030255	Apobec3	apolipoprotein B editing complex 3	-2.6	n.s.	n.s.
1431055_a_at	NM_028035	Snx10	sorting nexin 10	-2.5	-2.8	n.s.
1426971_at	NM_023738	Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like	-2.5	n.s.	n.s.
1448550_at	NM_008489	Lbp	lipopolysaccharide binding protein	-2.5	-2.5	n.s.
1426223_at	NM_028341	Ttc39c	tetratricopeptide repeat domain 39C	-2.5	-2.4	n.s.
1419534_at	NM_138648	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.5	-2.6	n.s.
1449153_at	NM_008605	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	-2.5	n.s.	n.s.
1435040_at	NM_028679	Irak3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	-2.5	n.s.	n.s.
1460407_at	NM_019866	Spib	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	-2.5	n.s.	n.s.
1422788_at	NM_021398	Slc43a3	solute carrier family 43, member 3	-2.4	n.s.	n.s.
1435208_at	NM_001013371	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)	-2.4	-2.5	n.s.
1448964_at	NM_009789	S100g	S100 calcium binding protein G	-2.4	n.s.	n.s.

1419549_at	NM_007482	Arg1	arginase 1, liver	-2.4	n.s.	n.s.
1421392_a_at	NM_007464	Birc3	baculoviral IAP repeat-containing 3	-2.4	n.s.	n.s.
1417291_at	NM_011609	Tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	-2.4	n.s.	n.s.
1424354_at	NM_197986	Tmem140	transmembrane protein 140	-2.4	n.s.	n.s.
1427680_a_at 1454834_at	NM_008687	Nfib	nuclear factor I/B	-2.4	-2.0	n.s.
1453181_x_at	NM_011636	Plscr1	phospholipid scramblase 1	-2.4	-2.1	n.s.
1417822_at	NM_033075	D17H6S56 E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	-2.4	-2.5	n.s.
1416527_at	NM_026405	Rab32	RAB32, member RAS oncogene family	-2.4	-2.5	n.s.
1417256_at	NM_008607	Mmp13	matrix metalloproteinase 13	-2.4	-2.9	n.s.
1422562_at	NM_019662	Rrad	Ras-related associated with diabetes	-2.4	n.s.	n.s.
1432032_a_at	NM_009711	Artn	artemin	-2.4	n.s.	n.s.
1455251_at	NM_001033228	Itga1	integrin alpha 1	-2.3	-2.4	n.s.
1448775_at	NM_001045481 NM_008328	Ifi203	interferon activated gene 203	-2.3	-2.7	n.s.
1417172_at	NM_019949	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	-2.3	-2.3	n.s.
1423754_at	NM_025378	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	-2.3	n.s.	n.s.
1452050_at	NM_177343	Camk1d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	-2.3	n.s.	n.s.
1420088_at 1438157_s_at 1448306_at 1449731_s_at	NM_010907	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-2.2	n.s.	n.s.
1460197_a_at	NM_054098	Steap4	STEAP family member 4	-2.2	-2.0	n.s.
1449305_at	NM_007972	F10	coagulation factor X	-2.2	n.s.	n.s.
1425669_at 1429284_at	NM_178061	Mobkl2b	MOB1, Mps one binder kinase activator-like 2B (yeast)	-2.2	-2.2	n.s.
1423878_at	NM_027863	Gypc	glycophorin C	-2.2	n.s.	n.s.
1421236_at 1450173_at	NM_138952	Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	-2.2	-2.1	n.s.
1433812_at	NM_001163170	Lix1l	Lix1-like	-2.2	n.s.	n.s.
1450808_at	NM_013521	Fpr1	formyl peptide receptor 1	-2.2	n.s.	n.s.
1448377_at	NM_011414	Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-2.2	n.s.	n.s.
1419468_at	NM_025809	Clec14a	C-type lectin domain family 14, member a	-2.2	n.s.	n.s.
1451474_a_at	NM_001081009	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	-2.2	-2.2	n.s.

1419714_at	NM_021893	Cd274	CD274 antigen	-2.1	n.s.	n.s.
1436562_at 1456890_at	NM_172689	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	-2.1	n.s.	n.s.
1417056_at	NM_011189	Psme1	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	-2.1	n.s.	n.s.
1450534_x_at	NM_019909	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	-2.1	n.s.	n.s.
1435488_at	NM_026788	Mthfd2l	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2-like	-2.1	-2.0	n.s.
1450424_a_at	NM_010531	Il18bp	interleukin 18 binding protein	-2.1	n.s.	n.s.
1426501_a_at	NM_145133	Tifa	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain	-2.1	-1.8	n.s.
1424032_at	NM_001042489 NM_028752	Hvcn1	hydrogen voltage-gated channel 1	-2.1	n.s.	n.s.
1418163_at	NM_021297	Tlr4	toll-like receptor 4	-2.0	n.s.	n.s.
1448330_at	NM_010358	Gstm1	glutathione S-transferase, mu 1	-2.0	n.s.	n.s.
1422573_at	NM_009667	Ampd3	AMP deaminase 3	-2.0	n.s.	n.s.
1436545_at 1455711_at	NM_172442	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-2.0	-1.8	n.s.
1417928_at	NM_019417	Pdlim4	PDZ and LIM domain 4	-1.9	n.s.	n.s.
1417066_at	NM_023341	Cabc1	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like (S. pombe)	-1.9	n.s.	n.s.
1426063_a_at	NM_010276	Gem	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	-1.9	n.s.	n.s.
1421858_at	NM_009615	Adam17	a disintegrin and metallopeptidase domain 17	-1.9	-1.7	n.s.
1422924_at	NM_009404	Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	-1.9	n.s.	n.s.
1425869_a_at	NM_011183	Psen2	presenilin 2	-1.9	n.s.	n.s.
1427127_x_at 1452318_a_at	NM_010478 NM_010479	Hspa1b	heat shock protein 1B	-1.9	n.s.	n.s.
1419592_at	NM_009472	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	-1.9	n.s.	n.s.
1420360_at 1458232_at	NM_010051	Dkk1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	-1.9	-2.1	n.s.
1423909_at 1441811_x_at	NM_025326	Tmem176a	transmembrane protein 176A	-1.9	n.s.	n.s.
1418854_at	NM_007465	Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	-1.9	n.s.	n.s.
1441096_at	NM_177709	Tusc5	tumor suppressor candidate 5	-1.9	n.s.	n.s.
1436739_at	NM_177322	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-1.9	n.s.	n.s.
1448724_at	NM_009895	Cish	cytokine inducible SH2-containing protein	-1.9	n.s.	n.s.

1437785_at	NM_175314	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.8	-1.9	n.s.
1424076_at	NM_025638	Gdpd1	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	-1.8	n.s.	n.s.
1455660_at	NM_007780	Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.8	n.s.	n.s.
1416942_at	NM_030711	Erap1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-1.8	-2.1	n.s.
1435431_at	NM_001101430	Psmg4	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4	-1.8	n.s.	n.s.
1417009_at	NM_023143	C1r	complement component 1, r subcomponent	-1.8	n.s.	n.s.
1434674_at	NM_010748	Lyst	lysosomal trafficking regulator	-1.8	n.s.	n.s.
1460014_at	NM_001033922 NM_172623	Trem14	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4	-1.8	-1.6	n.s.
1460081_at	NM_018801 NM_173067 NM_173068	Syt7	synaptotagmin VII	-1.8	-1.8	n.s.
1416998_at	NM_021511	Rrs1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)	-1.7	-1.8	n.s.
1433935_at	AK049415	AU020206	expressed sequence AU020206	-1.7	n.s.	n.s.
1442608_at	XM_146887 XM_917279	Layn	layilin	-1.7	n.s.	n.s.
1460116_s_at	NM_033524	Spred1	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence	-1.7	n.s.	n.s.
1428468_at	NM_001081343	3110043O21Rik	RIKEN cDNA 3110043O21 gene	-1.7	n.s.	n.s.
1449360_at	NM_007781	Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.7	n.s.	n.s.
1424711_at	NM_001033759 NM_031997	Tmem2	transmembrane protein 2	-1.7	n.s.	n.s.
1449399_a_at	NM_008361	Il1b	interleukin 1 beta	-1.7	-2.3	n.s.
1455358_at	NM_021477 NM_183188	A2bp1	Ataxin 2 binding protein 1	-1.7	-2.0	n.s.
1421358_at	NM_013819	H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3	-1.7	n.s.	n.s.
1425767_a_at	NM_011382	Six4	sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	-1.6	-1.8	n.s.
1446761_at	C77659	D8Ertd56e	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 56, expressed	-1.6	n.s.	n.s.
1438664_at	NM_011158	Prkar2b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	-1.6	n.s.	n.s.
1448940_at	NM_009277	Trim21	tripartite motif-containing 21	-1.6	n.s.	n.s.

1428250_at	NM_029771	Gper	G protein-coupled estrogen receptor 1	-1.6	n.s.	n.s.
1437929_at	NM_172826	Dact2	dapper homolog 2, antagonist of beta-catenin (xenopus)	-1.6	n.s.	n.s.
1456377_x_at	NM_172397	Limd2	LIM domain containing 2	-1.5	n.s.	n.s.
1422603_at	NM_201239 NM_021472	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	-1.5	n.s.	n.s.
1439155_at	NM_010792	Mettl1	methyltransferase-like 1	-1.5	n.s.	n.s.
1436173_at	NM_015802	Dlc1	deleted in liver cancer 1	-1.5	n.s.	n.s.
1457728_at	XM_001478428 XM_001478599	Fam129c	Fam129c family with sequence similarity 129, member C	-1.5	n.s.	n.s.
1439326_at	NM_172827	Lnpep	leucyl/cystinyl aminopeptidase	1.5	n.s.	n.s.
1433566_at	NM_001013386	Rasl10b	RAS-like, family 10, member B	1.5	n.s.	n.s.
1446771_at	NM_017379	Tuba8	tubulin, alpha 8	1.6	n.s.	n.s.
1460011_at	NM_175475	Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	1.6	n.s.	n.s.
1437025_at	NM_007642	CD28	CD28 antigen	1.8	n.s.	n.s.
1439396_x_at	NM_010271	Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	1.8	n.s.	n.s.
1449863_a_at	NM_010056 NM_198854	Dlx5	distal-less homeobox 5	1.8	2.0	n.s.
1417168_a_at	NM_016808 NM_198091 NM_198092	Usp2	ubiquitin specific peptidase 2	1.8	n.s.	n.s.
1452411_at	NM_172528	Lrrc1	leucine rich repeat containing 1	1.8	n.s.	n.s.
1434954_at	NM_019579	Mpp5	membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	1.9	n.s.	n.s.
1438404_at	NM_080563	Rnf144a	ring finger protein 144A	1.9	n.s.	n.s.
1454966_at	NM_001001309	Itga8	integrin alpha 8	1.9	2.7	n.s.
1450782_at	NM_009523	Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	1.9	n.s.	n.s.
1449335_at	NM_011595	Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	1.9	n.s.	n.s.
1420979_at	NM_011035	Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	2.0	n.s.	n.s.
1447886_at	AK002860	0610040B 09Rik	RIKEN cDNA 0610040B09 gene	2.0	n.s.	n.s.
1437605_at	NM_130456	Nphs2	nephrosis 2 homolog, podocin (human)	2.0	n.s.	n.s.
1419758_at	NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	2.0	2.3	n.s.
1418643_at	NM_025359	Tspan13	tetraspanin 13	2.0	n.s.	n.s.
1418182_at	NM_008975	Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3	2.0	n.s.	n.s.
1417622_at	NM_009194	Slc12a2	solute carrier family 12, member 2	2.1	2.8	n.s.

1442051_at	NM_019469 NM_178216	Hist2h3c1	histone cluster 2, H3c1	2.1	n.s.	n.s.
1435741_at 1437989_at	NM_172263	Pde8b	phosphodiesterase 8B	2.1	2.7	n.s.
1429144_at	NM_001042671 NM_028802	Prei4	preimplantation protein 4	2.1	n.s.	n.s.
1441727_s_at	NM_020589	Zfp467	zinc finger protein 467	2.2	n.s.	n.s.
1424852_at	NM_025282	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2.2	2.3	n.s.
1437347_at	NM_007904	Ednrb	endothelin receptor type B	2.2	n.s.	n.s.
1455361_at	NM_178681	Dgkb	diacylglycerol kinase, beta	2.2	2.5	n.s.
1456391_at	XM_129603 XM_916674	Tdrd5	tudor domain containing 5	2.2	n.s.	n.s.
1433959_at	NM_177086	Zmat4	zinc finger, matrin type 4	2.3	n.s.	n.s.
1438325_at	NM_007963	Evi1	ecotropic viral integration site 1	2.3	2.4	n.s.
1425518_at	NM_019688	Rapgef4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2.3	2.2	n.s.
1455301_at	XM_620310 XM_907001	Wipf3	WAS/WASL interacting protein family, member 3	2.3	n.s.	n.s.
1422869_at	NM_008587	Mertk	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	2.4	n.s.	n.s.
1416129_at	NM_133753	Errfi1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	2.4	2.3	n.s.
1417439_at	NM_054042	Cd248	CD248 antigen, endosialin	2.5	n.s.	n.s.
1441228_at	XM_355823 XM_905672	Apold1	apolipoprotein L domain containing 1	2.5	n.s.	n.s.
1422906_at	NM_011920	Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.5	2.2	n.s.
1420534_at 1434141_at	NM_021896	Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	2.6	3.0	n.s.
1416892_s_at 1448509_at	NM_025626	Fam107b	family with sequence similarity 107, member B	2.7	3.2	n.s.
1455050_at	NM_178791	E130203B 14Rik	RIKEN cDNA E130203B14 gene	2.7	2.6	n.s.
1423062_at	NM_008343	Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	2.7	n.s.	n.s.
1416164_at	NM_011812	Fbln5	fibulin 5	2.7	2.9	n.s.
1424842_a_at	NM_029270 NM_146161	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	2.8	n.s.	n.s.
1416855_at	NM_008086	Gas1	growth arrest specific 1	2.8	n.s.	n.s.
1435894_at	AK047704	C030014L 02	hypothetical protein C030014L02	2.8	n.s.	n.s.
1435321_at	NM_001001980	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	2.9	3.1	n.s.
1420838_at 1435196_at	NM_008745 NM_001025074	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	2.9	4.0	n.s.

1435184_at	NM_001039181 NM_008728	Npr3	natriuretic peptide receptor 3	2.9	2.7	n.s.
1445539_at	NM_013875	Pde7b	phosphodiesterase 7B	3.0	n.s.	n.s.
1420408_a_at 1435751_at 1435752_s_at	NM_001044720 NM_011511 NM_021041 NM_021042	Abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	3.1	5.4	n.s.
1425180_at 1425181_at	NM_144906	Sgip1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1	3.2	n.s.	n.s.
1422567_at 1454942_at	NM_022018	Niban	niban protein	3.3	2.8	n.s.
1418156_at	NM_021342	Kcne4	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	3.4	3.0	n.s.
1417156_at	NM_008471	Krt19	keratin 19	3.4	n.s.	n.s.
1418494_at	NM_010095	Ebf2	early B-cell factor 2	3.5	n.s.	n.s.
1426622_a_at	XM_128770 XM_898493	Qpct	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)	3.5	3.1	n.s.
1433825_at 1455917_at	NM_008746 NM_182809	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	3.5	n.s.	n.s.
1422084_at	NM_009759	Bmx	BMX non-receptor tyrosine kinase	3.6	4.2	n.s.
1440355_at	NM_175429	Kctd12b	potassium channel tetramerisation domain containing 12b	3.9	3.0	n.s.
1451478_at	NM_001039554 NM_020009	Angptl7	angiopoietin-like 7	4.0	n.s.	n.s.
1429579_at	AK018137	633040711 8Rik	RIKEN cDNA 6330407118 gene	4.0	4.1	n.s.
1425846_a_at	NM_021371	Caln1	calneuron 1	4.1	4.5	n.s.
1419302_at	NM_013905	Heyl	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	4.7	6.0	n.s.
1419405_at	NM_026523	Nmb	neuromedin B	5.1	5.0	n.s.
1438953_at 1438954_x_at 1449528_at	NM_010216	Figf	C-fos induced growth factor	5.3	6.4	n.s.
1428662_a_at 1451776_s_at	NM_175606	Hopx	HOP homeobox	5.7	5.9	n.s.
1433691_at	NM_016854	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	6.0	5.3	n.s.
1422454_at	NM_010662	Krt13	keratin 13	6.5	5.7	n.s.
1436268_at	XM_619356 XM_912147	Ddn	dendrin	6.9	n.s.	n.s.
1428664_at	NM_011702	Vip	vasoactive intestinal polypeptide	11.2	9.5	n.s.

Tabelle A 4: Einteilung der Tnfr1,2-/- differenziell exprimierten Gene in funktionelle Gengruppen.
Gezeigt sind die mit Hilfe von DAVID identifizierten, funktionellen Gengruppen in TNF-stimulierten Tnfr1,2-/- Glomeruli mit einem - im Vergleich zum Wildtyp - erreichten *enrichment score* von $\geq 1,3$ ($p < 0,05$).

GeneBank ID	Gene symbol	Gene name	Fold-change Tnfr1,2-/- versus WT
<u>Functional group 1: Chemokines and cytokines (enrichment score 8.86)</u>			
NM_023158	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-6.2
NM_203320	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	-22.4
NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	-24.9
NM_009141	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-7.8
NM_008599	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-5.4
NM_021274	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-21.0
NM_008176	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	-3.7
NM_011333	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-50.0
NM_031252	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	-3.2
NM_013653	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-10.6
NM_011338	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	-5.4
NM_013654	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-11.2
<u>Functional group 2: Integral membrane molecules and receptors (enrichment score: 4.57)</u>			
NM_011693	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	-23.8
NM_009318	Tapbp	TAP binding protein	-2.9
NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	-15.4
NM_145391	Tapbpl	TAP binding protein-like	-3.2
NM_009472	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	-1.9
NM_010398	C920025E04Rik	RIKEN cDNA C920025E04 gene	-4.6
NM_019909	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	-2.1
NM_008967	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)	-4.0
NM_010939	Nrp2	neuropilin 2	-3.1
NM_007904	Ednrb	endothelin receptor type B	2.2
NM_011920	Abcg2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2.5
NM_011610	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	-4.4
NM_013563	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	-2.9

NM_025638	Gdpd1	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	-1.8
NM_177322	Agtr1a	angiotensin II receptor, type 1a	-1.9
NM_011609	Tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	-2.4
NM_023122	Gpm6b	glycoprotein m6b	-6.7
NM_007781	Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.7
NM_007780	Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-1.8
NM_010509	Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	-3.1
NM_175316	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	-5.1
NM_011990	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	-2.7
NM_013521	Fpr1	formyl peptide receptor 1	-2.2
NM_010766	Marco	macrophage receptor with collagenous structure	-5.0
NM_020001	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	-4.1
NM_021364	Clec5a	C-type lectin domain family 5, member a	-2.8
NM_019948	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	-13.2
NM_010819	Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	-3.2
NM_138648	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	-2.5
NM_025809	Clec14a	C-type lectin domain family 14, member a	-2.2
XM_146887	Layn	layilin	-1.7
NM_054042	Cd248	CD248 antigen, endosialin	2.5
NM_008489	Lbp	lipopolysaccharide binding protein	-2.5
NM_130456	Nphs2	nephrosis 2 homolog, podocin (human)	2.0
NM_029771	Gper	G protein-coupled estrogen receptor 1	-1.6
NM_029084	Slamf8	SLAM family member 8	-4.9
NM_013591	Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	-9.1
NM_007514	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	-3.5
NM_009404	Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	-1.9
NM_025326	Tmem176a	transmembrane protein 176A	-1.9
NM_025359	Tspan13	tetraspanin 13	2.0
NM_030720	Gpr84	G protein-coupled receptor 84	-16.6

NM_017466	Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	-2.9
NM_023386	Rtp4	receptor transporter protein 4	-3.5
NM_023438	Tmem132e	transmembrane protein 132E	-5.6
NM_177709	Tusc5	tumor suppressor candidate 5	-1.9

Functional group 3: Innate immune effectors (enrichment score: 3.89)

NM_009778	C3	complement component 3	-5.2
NM_023143	C1r	complement component 1, r subcomponent	-1.8
NM_009776	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	-4.1
NM_007972	F10	coagulation factor X	-2.2
NM_013484	C2	complement component 2 (within H-2S)	-3.1
NM_008198	Cfb	complement factor B	-35.2
NM_017370	Hp	haptoglobin	-13.0

Functional group 4: Matrix metallopeptidases (enrichment score: 3.37)

NM_008605	Mmp12	matrix metallopeptidase 12	-2.5
NM_008607	Mmp13	matrix metallopeptidase 13	-2.4
NM_013599	Mmp9	matrix metallopeptidase 9	-3.6
NM_001003911	Adamts7	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 7	-6.5
NM_009615	Adam17	a disintegrin and metallopeptidase domain 17	-1.9
NM_010809	Mmp3	matrix metallopeptidase 3	-4.8
XM_128770	Qpct	glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)	3.5

Functional group 5: Metabolic enzymes, zink ion binding (enrichment score: 2.62)

NM_172827	Lnpep	leucyl/cystinyl aminopeptidase	1.5
NM_080563	Rnf144a	ring finger protein 144A	1.9
NM_175314	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	-1.8
NM_001003911	Adamts7	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 7	-6.5

Functional group 6: Cellular protein processing (enrichment score: 1.53)

NM_001037713	Xaf1	XIAP associated factor 1	-3.0
NM_016808	Usp2	ubiquitin specific peptidase 2	1.8
NM_023738	Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like	-2.5
NM_010724	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	-8.0
NM_019949	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	-2.4
NM_013585	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	-3.9
NM_013640	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	-7.9
NM_080563	Rnf144a	ring finger protein 144A	1.9
NM_001081009	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	-2.2

Functional group 7: Zinc ion binding proteins (enrichment score: 1.39)

NM_001001980	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	2.9
NM_019417	Pdlim4	PDZ and LIM domain 4	-1.9
NM_001013371	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)	-2.4
NM_177086	Zmat4	zinc finger, matrin type 4	2.3
NM_172442	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	-2.0
XM_129603	Tdrd5	tudor domain containing 5	2.2
NM_172397	Limd2	LIM domain containing 2	-1.5

Tabelle A 5: Zuordnung der differenziell regulierten Gene aus Tnfr1-/- Glomeruli zu GO-Termen.

In der Tabelle wurden alle 77 GO-Terme von TNF-stimulierten Tnfr1-/- Glomeruli aufgelistet. GO-Terme mit einem *EASE score* von $p \leq 0.05$, *fold enrichment* ≥ 1.5 und mindestens vier Genen pro Gruppe wurden als signifikant betrachtet. Die GO-Terme sind absteigend nach ihrem *fold-enrichment-score* sortiert.

GO term ID	GO term name	Fold enrichment	P-value	Gene count	% of regulated genes
GO:0008009	chemokine activity	22.8	3.54E-10	10	4.26
GO:0042379	chemokine receptor binding	22.3	4.53E-10	10	4.26
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	14.1	2.69E-03	4	1.70
GO:0001664	G-protein-coupled receptor binding	13.9	3.62E-08	10	4.26
GO:0006953	acute-phase response	12.5	3.79E-03	4	1.70
GO:0008217	regulation of blood pressure	9.2	2.05E-03	5	2.13
GO:0043123	positive regulation of I- κ B kinase/NF- κ B cascade	8.5	1.15E-02	4	1.70
GO:0002526	acute inflammatory response	8.3	4.97E-05	8	3.40
GO:0006935	chemotaxis	8.2	8.50E-07	11	4.68
GO:0042330	taxis	8.2	8.50E-07	11	4.68
GO:0006954	inflammatory response	8.2	2.51E-13	22	9.36
GO:0006956	complement activation	7.7	1.48E-02	4	1.70
GO:0043122	regulation of I- κ B kinase/NF- κ B cascade	7.7	1.48E-02	4	1.70
GO:0002541	activation of plasma proteins during acute inflammatory response	7.7	1.48E-02	4	1.70
GO:0007249	I- κ 3 kinase/NF- κ 3 cascade	7.4	1.30E-03	6	2.55
GO:0005125	cytokine activity	7.3	1.12E-10	19	8.09
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	7.2	1.77E-02	4	1.70
GO:0007586	digestion	7.2	1.77E-02	4	1.70
GO:0005507	copper ion binding	7.1	1.51E-03	6	2.55
GO:0009611	response to wounding	6.4	3.06E-12	24	10.21
GO:0030155	regulation of cell adhesion	5.9	2.94E-02	4	1.70
GO:0045087	innate immune response	5.9	1.16E-03	7	2.98
GO:0003013	circulatory system process	5.4	1.80E-03	7	2.98
GO:0008015	blood circulation	5.4	1.80E-03	7	2.98
GO:0006955	immune response	5.0	5.88E-14	33	14.04
GO:0002253	activation of immune response	5.0	1.72E-02	5	2.13

GO:0009605	response to external stimulus	4.9	4.61E-12	29	12.34
GO:0050776	regulation of immune response	4.8	3.44E-03	7	2.98
GO:0002682	regulation of immune system process	4.7	3.73E-03	7	2.98
GO:0003012	muscle system process	4.6	2.31E-02	5	2.13
GO:0006936	muscle contraction	4.6	2.31E-02	5	2.13
GO:0008083	growth factor activity	4.5	2.16E-03	8	3.40
GO:0002376	immune system process	4.3	1.83E-16	44	18.72
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	4.3	2.84E-02	5	2.13
GO:0002250	adaptive immune response	4.3	2.84E-02	5	2.13
GO:0007626	ocomotory behavior	4.3	2.68E-04	11	4.68
GO:0009968	negative regulation of signal transduction	4.2	3.12E-02	5	2.13
GO:0019882	antigen processing and presentation	4.1	1.50E-02	6	2.55
GO:0009967	positive regulation of signal transduction	4.0	3.63E-02	5	2.13
GO:0050778	positive regulation of immune response	3.9	3.85E-02	5	2.13
GO:0002684	positive regulation of immune system process	3.8	4.08E-02	5	2.13
GO:0004222	metalloendopeptidase activity	3.8	4.23E-02	5	2.13
GO:0006952	defense response	3.4	2.77E-08	29	12.34
GO:0051707	response to other organism	3.3	1.87E-02	7	2.98
GO:0007610	behavior	3.3	6.61E-04	13	5.53
GO:0009986	cell surface	2.9	2.02E-02	8	3.40
GO:0009607	response to biotic stimulus	2.9	1.23E-02	9	3.83
GO:0005102	receptor binding	2.9	2.30E-05	22	9.36
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	2.7	1.09E-02	10	4.26
GO:0006950	response to stress	2.7	5.43E-06	27	11.49
GO:0042221	response to chemical stimulus	2.7	9.79E-04	16	6.81
GO:0051704	multi-organism process	2.6	3.14E-02	8	3.40
GO:0009966	regulation of signal transduction	2.6	2.52E-03	14	5.96
GO:0016337	cell-cell adhesion	2.6	3.59E-02	8	3.40
GO:0002520	immune system development	2.4	4.93E-02	8	3.40
GO:0004175	endopeptidase activity	2.4	8.31E-03	13	5.53

GO:0007155	cell adhesion	2.4	1.07E-03	19	8.09
GO:0022610	biological adhesion	2.4	1.07E-03	19	8.09
GO:0005615	extracellular space	2.3	1.25E-09	55	23.40
GO:0044421	extracellular region part	2.3	1.39E-09	57	24.26
GO:0005829	cytosol	2.3	2.34E-02	11	4.68
GO:0005576	extracellular region	2.2	1.15E-09	60	25.53
GO:0048522	positive regulation of cellular process	2.2	8.30E-04	23	9.79
GO:0048518	positive regulation of biological process	2.1	3.91E-04	26	11.06
GO:0006508	proteolysis	2.1	4.49E-03	19	8.09
GO:0008233	peptidase activity	2.0	1.14E-02	17	7.23
GO:0006915	apoptosis	1.8	3.20E-02	15	6.38
GO:0030234	enzyme regulator activity	1.8	3.44E-02	15	6.38
GO:0012501	programmed cell death	1.8	3.63E-02	15	6.38
GO:0048513	organ development	1.8	2.16E-03	30	12.77
GO:0008219	cell death	1.8	4.68E-02	15	6.38
GO:0016265	death	1.7	4.77E-02	15	6.38
GO:0030154	cell differentiation	1.7	7.36E-04	38	16.17
GO:0048869	cellular developmental process	1.7	7.36E-04	38	16.17
GO:0007242	intracellular signaling cascade	1.7	1.47E-02	24	10.21
GO:0048731	system development	1.6	7.14E-03	33	14.04
GO:0048468	cell development	1.6	3.21E-02	23	9.79

Tabelle A 6: Zuordnung der differenziell regulierten Gene aus Tnfr1,2-/- Glomeruli zu GO-Termen.
In der Tabelle wurden alle 136 GO-Terme von TNF-stimulierten Tnfr1,2-/- Glomeruli aufgelistet. GO-Terme mit einem *EASE score* von $p \leq 0.05$, *fold enrichment* ≥ 1.5 und mindestens vier Genen pro Gruppe wurden als signifikant betrachtet. Die GO-Terme sind absteigend nach ihrem *fold-enrichment-score* sortiert.

GO term ID	GO term name	Fold enrichment	P-value	Gene count	% of regulated genes
GO:0008009	chemokine activity	19.7	1.29E-10	11.0	3.57
GO:0042379	chemokine receptor binding	19.2	1.70E-10	11.0	3.57
GO:0001664	G-protein-coupled receptor binding	12.0	2.26E-08	11.0	3.57
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	11.0	5.36E-03	4.0	1.30
GO:0000270	peptidoglycan metabolic process	9.5	8.31E-03	4.0	1.30
GO:0006958	complement activation, classical pathway	9.1	9.17E-03	4.0	1.30
GO:0042108	positive regulation of cytokine biosynthetic process	8.8	5.48E-04	6.0	1.95
GO:0008217	regulation of blood pressure	8.6	6.08E-04	6.0	1.95
GO:0050727	regulation of inflammatory response	8.6	1.10E-02	4.0	1.30
GO:0031347	regulation of defense response	8.6	1.10E-02	4.0	1.30
GO:0042330	taxis	8.2	1.43E-08	14.0	4.55%
GO:0006935	chemotaxis	8.2	1.43E-08	14.0	4.55%
GO:0006954	inflammatory response	7.6	6.30E-15	26.0	8.44%
GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	7.6	1.54E-02	4.0	1.30%
GO:0002541	activation of plasma proteins during acute inflammatory response	7.5	4.21E-03	5.0	1.62%
GO:0006956	complement activation	7.5	4.21E-03	5.0	1.62%
GO:0045727	positive regulation of translation	7.5	1.17E-03	6.0	1.95%
GO:0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process	7.0	1.62E-03	6.0	1.95%
GO:0009891	positive regulation of biosynthetic process	6.7	5.86E-04	7.0	2.27%
GO:0019955	cytokine binding	6.7	1.84E-04	8.0	2.60%
GO:0004295	trypsin activity	6.6	2.20E-02	4.0	1.30%
GO:0019965	interleukin binding	6.6	2.20E-02	4.0	1.30%
GO:0043123	positive regulation of I- κ B kinase/NF- κ B cascade	6.6	2.20E-02	4.0	1.30%
GO:0045087	innate immune response	6.6	1.93E-05	10.0	3.25%

GO:0002526	acute inflammatory response	6.5	2.30E-04	8.0	2.60%
GO:0019221	cytokine and chemokine mediated signaling pathway	6.4	7.64E-03	5.0	1.62%
GO:0009611	response to wounding	6.3	5.76E-15	30.0	9.74%
GO:0007219	Notch signaling pathway	6.1	8.72E-03	5.0	1.62%
GO:0004263	chymotrypsin activity	6.1	2.79E-02	4.0	1.30%
GO:0005125	cytokine activity	6.0	9.05E-10	20.0	6.49%
GO:0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	6.0	2.82E-02	4.0	1.30%
GO:0048589	developmental growth	6.0	9.30E-03	5.0	1.62%
GO:0042035	regulation of cytokine biosynthetic process	5.9	3.32E-03	6.0	1.95%
GO:0048583	regulation of response to stimulus	5.8	3.16E-02	4.0	1.30%
GO:0007586	digestion	5.6	3.34E-02	4.0	1.30%
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	5.6	3.34E-02	4.0	1.30%
GO:0019882	antigen processing and presentation	5.4	9.92E-05	10.0	3.25%
GO:0006955	immune response	5.4	4.24E-20	45.0	14.61%
GO:0016064	immunoglobulin mediated immune respons	5.3	5.39E-03	6.0	1.95%
GO:0019724	B cell mediated immunity	5.2	6.02E-03	6.0	1.95%
GO:0042089	cytokine biosynthetic process	5.1	6.35E-03	6.0	1.95%
GO:0030326	embryonic limb morphogenesis	5.1	1.64E-02	5.0	1.62%
GO:0035113	embryonic appendage morphogenesis	5.1	1.64E-02	5.0	1.62%
GO:0009605	response to external stimulus	5.1	5.38E-16	38.0	12.34%
GO:0042107	cytokine metabolic process	5.0	6.70E-03	6.0	1.95%
GO:0008081	phosphoric diester hydrolase activity	5.0	1.79E-02	5.0	1.62%
GO:0008015	blood circulation	4.9	1.28E-03	8.0	2.60%
GO:0003013	circulatory system process	4.9	1.28E-03	8.0	2.60%
GO:0007249	I- κ B kinase/NF- κ B cascade	4.8	2.01E-02	5.0	1.62%
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	4.7	3.59E-03	7.0	2.27%
GO:0002253	activation of immune response	4.7	8.65E-03	6.0	1.95%
GO:0002250	adaptive immune response	4.7	3.59E-03	7.0	2.27%
GO:0048747	muscle fiber development	4.7	2.20E-02	5.0	1.62%
GO:0048741	skeletal muscle fiber development	4.7	2.20E-02	5.0	1.62%

GO:0002376	immune system process	4.6	8.46E-24	60.0	19.48%
GO:0042692	muscle cell differentiation	4.5	2.41E-02	5.0	1.62%
GO:0035108	limb morphogenesis	4.4	2.63E-02	5.0	1.62%
GO:0035107	appendage morphogenesis	4.4	2.63E-02	5.0	1.62%
GO:0008083	growth factor activity	4.4	4.95E-04	10.0	3.25%
GO:0050778	positive regulation of immune response	4.3	5.77E-03	7.0	2.27%
GO:0050776	regulation of immune response	4.3	2.68E-03	8.0	2.60%
GO:0060173	limb development	4.2	2.98E-02	5.0	1.62%
GO:0048736	appendage development	4.2	2.98E-02	5.0	1.62%
GO:0007626	locomotory behavior	4.2	2.74E-05	14.0	4.55%
GO:0002684	positive regulation of immune system process	4.2	6.30E-03	7.0	2.27%
GO:0002682	regulation of immune system process	4.2	2.93E-03	8.0	2.60%
GO:0051247	positive regulation of protein metabolic process	4.2	1.42E-02	6.0	1.95%
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	4.0	1.74E-02	6.0	1.95%
GO:0009968	negative regulation of signal transduction	3.9	1.81E-02	6.0	1.95%
GO:0002443	leukocyte mediated immunity	3.7	2.26E-02	6.0	1.95%
GO:0042060	wound healing	3.6	4.98E-02	5.0	1.62%
GO:0003012	muscle system process	3.6	4.98E-02	5.0	1.62%
GO:0006936	muscle contraction	3.6	4.98E-02	5.0	1.62%
GO:0004222	metalloendopeptidase activity	3.6	2.63E-02	6.0	1.95%
GO:0009607	response to biotic stimulus	3.5	1.71E-04	14.0	4.55%
GO:0007610	behavior	3.5	1.43E-05	18.0	5.84%
GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process	3.5	1.47E-02	7.0	2.27%
GO:0001816	cytokine production	3.4	3.17E-02	6.0	1.95%
GO:0006952	defense response	3.4	2.44E-10	37.0	12.01%
GO:0051707	response to other organism	3.4	5.51E-03	9.0	2.92%
GO:0009897	external side of plasma membrane	3.1	2.41E-02	7.0	2.27%
GO:0030163	protein catabolic process	3.1	4.67E-03	10.0	3.25%
GO:0002252	immune effector process	3.1	2.44E-02	7.0	2.27%
GO:0006959	humoral immune response	3.0	4.90E-02	6.0	1.95%
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	3.0	8.17E-04	14.0	4.55%

GO:0005792	microsome	2.9	3.23E-02	7.0	2.27%
GO:0005102	receptor binding	2.9	1.46E-06	28.0	9.09%
GO:0043065	positive regulation of apoptosis	2.9	1.31E-02	9.0	2.92%
GO:0042221	response to chemical stimulus	2.9	2.76E-05	22.0	7.14%
GO:0007517	muscle development	2.9	2.19E-02	8.0	2.60%
GO:0042598	vesicular fraction	2.8	3.66E-02	7.0	2.27%
GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	2.8	1.42E-02	9.0	2.92%
GO:0045859	regulation of protein kinase activity	2.8	3.95E-02	7.0	2.27%
GO:0048598	embryonic morphogenesis	2.7	2.81E-02	8.0	2.60%
GO:0006950	response to stress	2.7	3.62E-07	34.0	11.04%
GO:0043549	regulation of kinase activity	2.7	4.66E-02	7.0	2.27%
GO:0005529	sugar binding	2.6	3.25E-02	8.0	2.60%
GO:0004175	endopeptidase activity	2.6	6.10E-04	18.0	5.84%
GO:0051704	multi-organism process	2.6	1.54E-02	10.0	3.25%
GO:0042981	regulation of apoptosis	2.6	6.13E-04	18.0	5.84%
GO:0043067	regulation of programmed cell death	2.6	7.07E-04	18.0	5.84%
GO:0009986	cell surface	2.5	2.57E-02	9.0	2.92%
GO:0006508	proteolysis	2.4	4.06E-05	28.0	9.09%
GO:0008233	peptidase activity	2.4	9.38E-05	26.0	8.44%
GO:0043285	biopolymer catabolic process	2.4	2.53E-02	10.0	3.25%
GO:0002520	immune system development	2.3	2.70E-02	10.0	3.25%
GO:0030246	carbohydrate binding	2.3	2.94E-02	10.0	3.25%
GO:0008219	cell death	2.3	2.40E-04	25.0	8.12%
GO:0016265	death	2.3	2.50E-04	25.0	8.12%
GO:0012501	programmed cell death	2.3	3.54E-04	24.0	7.79%
GO:0048534	hemopoietic or lymphoid organ development	2.3	4.63E-02	9.0	2.92%
GO:0006915	apoptosis	2.2	6.86E-04	23.0	7.47%
GO:0009966	regulation of signal transduction	2.2	7.94E-03	15.0	4.87%
GO:0009888	tissue development	2.2	3.91E-02	10.0	3.25%
GO:0005615	extracellular space	2.1	4.85E-09	64.0	20.78%
GO:0048468	cell development	2.1	1.59E-05	39.0	12.66%
GO:0008283	cell proliferation	2.1	7.41E-03	17.0	5.52%

GO:0044421	extracellular region part	2.1	3.32E-09	67.0	21.75%
GO:0030154	cell differentiation	2.0	1.51E-07	57.0	18.51%
GO:0048869	cellular developmental process	2.0	1.51E-07	57.0	18.51%
GO:0005576	extracellular region	2.0	2.12E-09	71.0	23.05%
GO:0048518	positive regulation of biological process	2.0	3.32E-04	31.0	10.06%
GO:0009887	organ morphogenesis	2.0	1.40E-02	16.0	5.19%
GO:0048522	positive regulation of cellular process	2.0	9.75E-04	27.0	8.77%
GO:0005829	cytosol	1.9	4.89E-02	12.0	3.90%
GO:0048513	organ development	1.9	6.71E-05	41.0	13.31%
GO:0006468	protein amino acid phosphorylation	1.8	2.17E-02	18.0	5.84%
GO:0048731	system development	1.7	7.39E-04	44.0	14.29%
GO:0048523	negative regulation of cellular process	1.7	1.86E-02	24.0	7.79%
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1.6	1.20E-02	29.0	9.42%
GO:0048519	negative regulation of biological process	1.6	2.12E-02	25.0	8.12%
GO:0048856	anatomical structure development	1.6	6.10E-04	50.0	16.23%
GO:0032502	developmental process	1.6	1.86E-05	73.0	23.70%
GO:0050896	response to stimulus	1.6	5.76E-06	82.0	26.62%
GO:0007275	multicellular organismal development	1.5	9.86E-04	53.0	17.21%
GO:0007242	intracellular signaling cascade	1.5	2.45E-02	28.0	9.09%

7 Literaturverzeichnis

- [1] Neil A. Campbell, Biologie, 1997.
- [2] www.apotheken-umschau.de/multimedia
- [3] <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/service/d-service.php>
- [4] Ursula Baum: Anatomie und Physiologie. Band 1. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 7. Aufl. 2004, ISBN 9783930192625.
- [5] Robert F. Schmidt und Florian Lang: Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. Springer, 30. Aufl. 2007, ISBN 9783540329084.
- [6] Uwe Gille: Harn- und Geschlechtssystem, Apparatus urogenitalis. In: Salomon/Geyer/Gille (Hrsg.): Anatomie für die Tiermedizin. Enke-Verlag Stuttgart, 2. erw. Aufl. 2008, ISBN 978-3-8304-1075-1.
- [7] QUASI Niere, Qualitätssicherung in der chronischen Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation), Bericht 2002/2003 und Bericht 2006/2007
- [8] Thaiss, Friedrich; Stahl, Rolf A. K. IgA-Nephropathie: Klinik, Pathogenese und Therapie der häufigsten Glomerulonephritis, Dtsch Arztebl 2000; 97(41): A-2708 / B-2302 / C-2048, MEDIZIN.
- [9] Ambrus J. L and Sridaher N. R. Immunologic aspects of renal disease. JAMA 287 (22):1938-1945, Dec 1997.
- [10] Daha M.R.. Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. J Nephrol, 13 Suppl 3:S89-S95, 2000.
- [11] W. G. Couser. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant, 13 Suppl 1:10-15, 1998.
- [12] Carmen Gomez-Guerrero, Purificacion Hernandez-Vargas, Oscar Lopez-Franco, Guadalupe Ortiz-Munoz, and Jesus Egido. Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches. Curr Drug Targets Inflamm allergy, 4 (3):341-351, Jun 2005.
- [13] David P D`Cruz, Munther A Khamashta and Graham R V Hughes. Systemic lupus erythematosus. Lancet, 369 (9561):1509-1515, May 1999.
- [14] 10. Mai. 2008 Welt-Lupus-Tag; www.worldlupusday.org

- [15] Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport und Mark Shlomchik. Immunologie. 5.Auflage 2002 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- [16] Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35: 311-318, 1992.
- [17] Balow, J.E., Austin, H. A. 3rd: Therapy of membranous nephropathy in systemic lupus erythematosus. *Semin. Nephrol.* 23, 386-391, 2003.
- [18] Philipp Enghard, Dissertation: Charakterisierung der T-Zell Infiltration bei muriner Lupusnephritis, Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin, 2006.
- [19] Cameron, J.S.: Lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 413-424, 1999.
- [20] David P D'Cruz, Munther A Khamashta, and Graham R V Hughes. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 369(9561):587-596. Feb 2007.
- [21] Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 278: 533-538, 1968.
- [22] Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 338: 1359-1368, 1998.
- [23] Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, et al. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 37: 1684-1688, 1994.
- [24] Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37: 269-390, 1985.
- [25] Boucher A, Droz D, Adafer E, Noel LH. Characterization of mononuclear cell subsets in renal cellular interstitial infiltrates. *Kidney Int* 29: 1043-1049, 1986.
- [26] Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, et al. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 44: 2097-2106, 2001.
- [27] Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB, Cameron JS. Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney Int* 37: 100-109, 1990.
- [28] Weening J.J., D'Agati V.D., Schwartz M.M., Seshan S.V., Alpers C.E., Appel G.B., Balow J.E., Bruijn J.A., Cook T., Ferrario F., Fogo A.B., Ginzler E.M., Hebert L., Hill G., Hill P., Jennette J.C., Kong N.C., Lesavre P., Lockshin M., Looi L.M., Makino H., Moura L.A., Nagata M.: International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus Nephritis; Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.*, 65, 521-530, 2004.

- [29] Watanabe-Fukunaga R: Lymphoproliferation disorder in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317, 1992.
- [30] Pérez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1369-1382, 2001.
- [31] Vielhauer V, Mayadas TN. Function of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Semin. Nephrol.*;27:286-308, 2007.
- [32] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*; 14: 185–191, 2003.
- [33] Hernandez T, Mayadas TN. Immunoregulatory role of TNF α in inflammatory kidney diseases. *Kidney Int.*;76(3):262-76, 2009.
- [34] Gommerman JL, Browning JL: Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 3, 642-55, 2003.
- [35] Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. and Cerretti, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385, 729-733, 1997.
- [36] Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L. and . Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370, 555-557, 1994.
- [37] Baud, V. and Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.*, 11, 372-377, 2001.
- [38] Vielhauer V, Anders HJ, Pérez de Lema G, Luckow B, Schlöndorff D, Mack M. Phenotyping renal leukocyte subsets by four-color flow cytometry: characterization of chemokine receptor expression. *Nephron Exp. Nephrol.* 93: e63-e71, 2003
- [39] Adolf, R.A., Grell, M., and Scheurich, P. Tumor necrosis factor. In "Epidermal growth factors and cytokines", T.A. Luger and T. Schwarz, eds., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 63-88, 1994.
- [40] Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor α antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 1082-1091, 1996.

- [41]Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meinders AE, Maini RN. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 1077-1081, 1996.
- [42]Thomas Hehlhans and Klaus Pfeffer. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology Bd.* 115, S. 1-20, 2005.
- [43]Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 2830-2834, 1990.
- [44]Fuchs, P., Strehl, S., Dworzak, M., Himmeler, A., and Ambros, P.F. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNF-R1) and localization to chromosom 12p13. *Genomics* 13: 219-24, 1992.
- [45]Baker, E., Chen, L.Z., Smith, C.A., Callen, D.F., Goodwin, R., and Sutherland, G.R. Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenetics & Cell Genetics* 57: 117-18, 1991.
- [46]Naismith,J.H. and Sprang,S.R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 74-79, 1998.
- [47]MacEwan D.J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.*, 14, 477-492, 2002.
- [48]Aggarwal,B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 745-756, 2003.
- [49]Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor-necrosis-factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor-necrosis-factor receptor. *Cell*, 83, 793 ± 802, 1995.
- [50]Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death, *Cell* 74(5):845-53, 1993.
- [51]Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L. and Lenardo,M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351-2354, 2000.
- [52]Chen,G. and Goeddel,D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 1634-1635, 2002.

- [53] Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. and Goeddel, D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4, 387-396, 1996a.
- [54] Arch R.H., Gedrich, R.W. and Thompson, C.B. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.*, 12, 2821-2830, 1998.
- [55] Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12, 419-429, 2000.
- [56] Delhase M., Hayakawa, M., Chen, Y. and Karin, M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*, 284, 309-313, 1999.
- [57] Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84, 299-308, 1996b.
- [58] Kischkel F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, 14, 5579-5588, 1995.
- [59] Micheau, O. and Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114, 181-190, 2003.
- [60] Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G.M. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278, 25534-25541, 2003.
- [61] Wajant H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.*, 10, 45-65, 2003.
- [62] Haridas, V., Darnay, B. G., Natarajan, K., Heller, R., and Aggarwal, B. B. Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation, *J Immunol* 160(7):3152-62, 1998.
- [63] Helms, M. J., Mohamed, A. A., and MacEwan, D. J. Modulated kinase activities in cells undergoing tumour necrosis factor-induced apoptotic cell death, *FEBS Lett* 505(1):68-74, 2001.

- [64]Jupp, O. J., McFarlane, S. M., Anderson, H. M., Littlejohn, A. F., Mohamed, A. A., MacKay, R. H., Vandenabeele, P., and MacEwan, D. J. Type II tumour necrosis factor- α receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways, *Biochem J* 359(Pt 3):525-35, 2001.
- [65]Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L. T. Tumor necrosis factor α -induced activation of c-jun Nterminal kinase is mediated by TRAF2, *Embo J* 16(5):1080-92, 1997.
- [66]Natoli,G., Costanzo,A., Ianni,A., Templeton,D.J., Woodgett,J.R., Balsano,C. and Levvero,M. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science*, 275, 200-203, 1997.
- [67]Gotoh,Y. and Cooper,J.A. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor- α signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 273, 17477-17482, 1998.
- [68]Tournier,C., Dong,C., Turner,T.K., Jones,S.N., Flavell,R.A. and Davis,R.J. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.*, 15, 1419-1426, 2001.
- [69]Yuasa,T., Ohno,S., Kehrl,J.H. and Kyriakis,J.M. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.*, 273, 22681-22692, 1998.
- [70]Beyaert,R., Cuenda,A., Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Lee,J.C., Haegeman,G., Cohen,P. and Fiers,W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.*, 15, 1914-1923, 1996.
- [71]Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K. and Holtmann,H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.*, 18, 4969-4980, 1999.
- [72]Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Boone,E., De Bosscher,K., Schmitz,M.L., Fiers,W. and Haegeman,G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.*, 273, 3285-3290, 1998.
- [73]Pimentel-Muinos, F. X., and Seed, B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation, *Immunity* 11(6):783-93, 1999.

- [74]Pan, S., An, P., Zhang, R., He, X., Yin, G., and Min, W. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis, *Mol Cell Biol* 22(21):7512-23, 2002.
- [75]Beck, S. C., and Meyer, T. F. IgA1 protease from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits TNF α -mediated apoptosis of human monocytic cells, *FEBS Lett* 472(2-3):287-92, 2000.
- [76]Holtmann, M. H., Douni, E., Schutz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H. A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P. R., Kollias, G., and Neurath, M. F. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo, *Eur J Immunol* 32(11):3142-51, 2002.
- [77]Butera, S. T., Roberts, B. D., and Folks, T. M. Ligand passing by the p75 tumour necrosis factor receptor enhances HIV-1 activation, *Cytokine* 8(10):745-50, 1996.
- [78]Nokta, M., Rossero, R., Loesch, K., and Pollard, R. B. Kinetics of tumor necrosis factor α and soluble TNFRII in HIVinfected patients treated with a triple combination of stavudine, didanosine, and hydroxyurea, *AIDS Res Hum Retroviruses* 13(18):1633-8, 1997.
- [79]Chan, F. K., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M. J. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses, *J Biol Chem* 278(51):51613-21, 2003.
- [80]Dannecker G, Wagner N. Zusammenfassung: Pathogenese der Autoimmunkrankheiten. 2007. In: Pädiatrische Rheumatologie. Wagner N. Dannecker G Hrsg. Springer, Heidelberg 64-68, ISBN-13 978-3-540-32814
- [81]Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377: 348-351, 1995.
- [82]Speiser DE, Sebzda E, Ohteki T, Bachmann MF, Pfeffer K, Mak TW, Ohashi PS. Tumor necrosis factor receptor p55 mediates deletion of peripheral cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur. J. Immunol.* 26: 3055-3060, 1996.
- [83]Herbein G, Mahlkecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, O'Brien WA, Verdin E. Apoptosis of CD8⁺ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 395: 189-194, 1998.
- [84]Smith, C.A., et al. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76: 959-962, 1994.
- [85]Tartaglia, L.A., et al. A novel domain within the 55 kDa TNF receptor signals cell death. *Cell* 74: 845-853, 1993.

- [86] Vassilli P.: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 411–452, 1992.
- [87] Lorenz, H.M. and J.R. Kalden, Perspectives for TNF-alpha-targeting therapies. *Arthritis Res*, 2002. 4 Suppl 3: p. S17-24.
- [88] William BT. Serious adverse events associated with use of anti-TNF α drugs. In: Center for Drug and Evaluation and Research, FDA documentation. http://www.fda.gov/cder/present/DIA2004/Tauber_files/frame.htm, 2004.
- [89] Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 315-321, 2002.
- [90] van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47: 1531-1534, 1996.
- [91] Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J. Exp. Med.* 193: 427-434, 2001.
- [92] Niemir ZI, Ondracek M, Dworacki G et al. In situ upregulation of IL-10 reflects the activity of human glomerulonephritides. *Am J Kidney Dis*; 32: 80–92, 1998.
- [93] Aten J, Roos A, Claessen N et al. Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*; 11: 1426–1438, 2000.
- [94] Neale TJ, Ruger BM, Macaulay H et al. Tumor necrosis factor-alpha is expressed by glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy. *Am J Pathol*; 146: 1444–1454, 1995.
- [95] Takemura T, Yoshioka K, Murakami K et al. Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Arch*; 424: 459–464, 1994.
- [96] Ozen S, Saatci U, Tinaztepe K et al. Urinary tumor necrosis factor levels in primary glomerulopathies. *Nephron*; 66: 291–294, 1994.
- [97] Le Hir M, Haas C, Marino M et al. Prevention of crescentic glomerulonephritis induced by anti-glomerular membrane antibody in tumor necrosis factor-deficient mice. *Lab Invest*; 78: 1625–1631, 1998.

- [98]Ryffel B, Eugster H, Haas C et al. Failure to induce anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in TNF alpha/beta deficient mice. *Int J Exp Pathol*; 79: 453–460, 1998.
- [99]Bertani T, Abbate M, Zoja C, Corna D, Perico N, Ghezzi P, Remuzzi G. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am. J. Pathol.* 134: 419-430, 1989.
- [100]Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A, Rees AJ. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J. Immunol.* 142: 3083-3090, 1989.
- [101]Moore KJ, Yeh K, Naito T, Kelley VR. TNF-alpha enhances colony-stimulating factor-1-induced macrophage accumulation in autoimmune renal disease. *J. Immunol.* 157: 427-432, 1996.
- [102]Timoshanko JR, Sedgwick JD, Holdsworth SR et al. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*; 14: 1785–1793, 2003.
- [103]Vielhauer V, Stavrakis G, Mayadas TN. Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest*; 115: 1199–1209, 2005.
- [104]Lai KN, Leung JC, Chan LY et al. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF- α : glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F945–F955
- [105]Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ. CCR 1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 66: 2264-2278, 2004.
- [106]Takemoto M. et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 161:799-805, 2002.
- [107]Akis N, Madaio MP: Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli. *Kidney Int* 2004, 65:2223-2227.
- [108]Satriano JA, Banas B, Luckow B, Nelson P, Schlöndorff DO: Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997, 8:596-603.
- [109]Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405:827-36. Review 2000.
- [110]<http://www.affymetrix.com/products/arrays/index.affx>.

- [111] <http://rmaexpress.bmbolstad.com/>
- [112] Irizarry, RA, Hobbs, B, Collin, F, Beazer-Barclay, YD, Antonellis, KJ, Scherf, U, Speed, TP Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data. *Biostatistics* .Vol. 4, Number 2: 249-264, 2003.
- [113] Tusher V.G., Tibshirani R., & Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5116-5121.
- [114] <http://genome.tugraz.at>
- [115] Manoli, T.; Gretz, N.; Groene, H.J.; Kenzelmann, M.; Eils, R. ; Brors, B.: Group testing for pathway analysis improves comparability of different microarray data sets. In: *Bioinformatics* 22 (20) (2006), S. 2500-2506.
- [116] <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
- [117] Ashburner, M. ; Ball, C.A. ; Blake, J.A. ; Botstein, D. ; Butler, H. ; Cherry, J.M. ; Davis, A.P. ; Dolinski, K. ; Dwight, S.S. ; Eppig, J.T. ; Harris, M.A. ; Hill, D.P. ; Issel-Tarver, L. ; Kasarskis, A. ; Lewis, S. ; Matese, J.C. ; Richardson, J.E. ; Ringwald, M. ; Rubin, G.M. ; Sherlock, G.: Gene Ontology: tool for the uni_cation of biology. The Gene Ontology Consortium. In: *Nature Genetics* 25 (1) (2000), S. 25-29. - URL <http://www.geneontology.org/>.
- [118] Kanehisa, M. ; Goto, S. ; Hattori, M. ; Aoki-Kinoshita, K.F. ; Itoh, M.; Kawashima, S.; Katayama, T. ; Araki, M. ; Hirakawa, M.: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), S. D354-357.
- [119] Pfeffer, K. and Matsuyama, T. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-467.
- [120] Chabardes-Garonne, D., Mejean, A., Aude, J. C., Cheval, L., Di Stefano, A., Gaillard, M. C., Imbert-Teboul, M., Wittner, M., Balian, C., Anthouard, V., Robert, C., Segurens, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Doucet, A., and Elalouf, J. M. (2003). A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 13710-13715.
- [121] Tryggvason, K.: Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration: Nephritin, a Key Component of the Slit Diaphragm. In: *J Am Soc Nephrol*. Nr. 10, 1999, S. 2440-2445.
- [122] Benzing, T.: Signaling at the Slit Diaphragm *J Am Soc Nephrol* 2004 15: 1382-1391.

- [123] Neumann B, Machleidt T, Lifka A, Pfeffer K, Vestweber D, Mak TW, Holzmann B and Kronke M (1996): Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *The Journal of Immunology*, Vol 156, Issue 4 1587-1593.
- [124] Vielhauer V, Stavrakis G, Mayadas TN. Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest*; 115: 1199–1209, 2005.
- [125] Wolf G, Aberle S, Thaiss F, Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RA. TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int*, 4(4):795-804, Oct 1993.
- [126] Jones, S.A. (2005): Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-8.
- [127] Kaplanski, G., Marin, V., Fabrigoule, M., Boulay, V., Benoliel, A.-M., Bongrand, P., Kaplanski, S. and Farnarier, C. 1998. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 92:1259-1267.
- [128] Heiska, L., Alfthan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. and Carpen, O. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). *J. Biol. Chem.* 273:21893-21900.
- [129] Liu, S. M., and T. Sundqvist. Involvement of nitric oxide in permeability alteration and F-actin redistribution induced by phorbol myristate acetate in endothelial cells. *Exp Cell Res* 221: 289-93, 1995.
- [130] Yin, H.L., Hartwig, J.H., Maruyama, K. and Stossel, T.P. (1981) Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem*, 256, 9693-9697.
- [131] Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 2000;52:91-112.
- [132] Lazar, T., Gotte, M. & Gallwitz, D. Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* 22, 468-472 (1997).
- [133] Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81, 153-208 (2001).

- [135]Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Pérez de Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ. Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 337-347, 2004.
- [136]Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Invest.* 92: 2719-2730, 1993.
- [137]Luscinskas FW, Ding H, Lichtman AH. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4⁺ T lymphocytes on tumor necrosis factor α -activated vascular endothelium under flow. *J. Exp. Med.* 181: 1179-1186, 1995.)
- [138]Hickey MJ, Reinhardt PH, Ostrovsky L, Jones WM, Jutila MA, Payne D, Elliott J, Kubes P. Tumor necrosis factor- α induces leukocyte recruitment by different mechanisms in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 158: 3391-3400, 1997.
- [139]Lim YC, Garcia-Cardena G, Allport JR, Zervoglos M, Connolly AJ, Gimbrone MA, Jr., Luscinskas FW. Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am. J. Pathol.* 162: 1591-1601, 2003.
- [140]Anders HJ, Belemzova E, Eis V, Segerer S, Vielhauer V, Pérez de Lema G, Kretzler M, Cohen CD, Frink M, Horuk R, Hudkins KL, Alpers CE, Mampaso F, Schlöndorff D. Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1504-1513, 2004.
- [141]Richez C, Blanco P, Dumoulin C, Schaefferbeke T. Lupus erythematosus manifestations exacerbated by etanercept therapy in a patient with mixed connective tissue disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23: 273, 2005.
- [142]Mor A, Bingham C, III, Barisoni L, Lydon E, Belmont HM. Proliferative lupus nephritis and leukocytoclastic vasculitis during treatment with etanercept. *J. Rheumatol.* 32: 740-743, 2005.
- [143]Zhou T, Edwards CK, III, Yang P, Wang Z, Bluethmann H, Mountz JD. Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in lpr mice lacking tumor necrosis factor receptor I. *J. Immunol.* 156: 2661-2665, 1996.
- [144]Douni E, Kollias G. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin α , or the p55TNF-R. *J. Exp. Med.* 188: 1343-1352, 1998.

- [145] Lucas R, Garcia I, Donati YR, Hribar M, Mandriota SJ, Giroud C, Buurman WA, Fransen L, Suter PM, Nunez G, Pepper MS, Grau GE. Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 3577-3586, 1998.
- [146] Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J. Biol. Chem.* 280: 36099-36109, 2005.
- [147] Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN et al. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest* 2001; 81: 1503–1515.
- [148] Bradley JR, Thiru S, and Pober J (1995). Disparate localisation of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am J Pathol* 146:27–32.
- [149] Jones SJ, Ledgerwood EC, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, and Bradley JR (1999). TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* 162: 1042–1048.
- [150] Anders HJ et al, Chemokines and Chemokine Receptors are involved in the Resolution or Progression of Renal Disease. *Kidney Int* 63(2):401-15, 2003.
- [151] Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 940-948, 2004.
- [152] Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am. J. Pathol.* 165: 237-246, 2004.
- [153] Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Exp. Med.* 190: 1813-1824, 1999.
- [154] Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 48: 2555-2566, 2003.

- [155] Pérez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla S, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlöndorff D, Luckow B. Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 3592-3601, 2005.
- [156] Mulligan MS, Johnson KJ, Todd RF, 3rd, Issekutz TB, Miyasaka M, Tamatani T, Smith CW, Anderson DC, Ward PA: Requirements for leukocyte adhesion molecules in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 1993, 91:577-587.
- [157] Segerer S, Schlöndorff D: Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. *Semin Nephrol* 2007, 27:260-274.
- [158] Seelen MA, Daha MR: The role of complement in autoimmune renal disease. *Autoimmunity* 2006, 39:411-415.
- [159] Han CY, Subramanian S, Chan CK, Omer M, Chiba T, Wight TN, Chait A: Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes* 2007, 56:2260-2273.
- [160] Tveita A, Rekvig OP, Zykova SN: Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10:229.
- [161] Ronco P, Chatziantoniou C: Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives. *Kidney Int* 2008, 74:873-878.
- [162] Huang TH, Shui HA, Ka SM, Tang BL, Chao TK, Chen JS, Lin YF, Chen A. Rab 23 is expressed in the glomerulus and plays a role in the development of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(3):743-754.
- [163] GRELL, M., BECKE, F.M., WAJANT, H., MANNEL, D.N. & SCHEUR- ICH, P. (1998a). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.*, 28, 257 ± 263.
- [164] Pinckard JK, Sheehan KC, Schreiber RD: Ligand-induced formation of p55 and p75 tumor necrosis factor receptor heterocomplexes on intact cells. *J Biol Chem* 1997, 272:10784-10789.
- [165] Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J. Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 2005; 6:1070-1077.
- [166] Schlöndorff D.:The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J*, 1(4): 272-281, Oct 1987.
- [167] P. Mene, M. S. Simonson and M. J. Dunn. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev*, 69(4): 1347-1424, Oct 1989.

- [168] Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, and Max M. Cytokines and mesangial cells. *Kidney Int Suppl*, 39:S26-S31, Jan 1993.
- [169] Gauer S, J. Yao, Schoecklmann HO, and. Sterzel RB. Adhesion molecules in the glomerular mesangium. *Kidney Int*, 51(5): 1447-1453, May 1997.
- [170] Satriano JA, Banas B, Luckow B, Nelson P, and Schlondorff DO. Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 8(4):596-603, Apr 1997.
- [171] Wolf G, Aberle S, Thaiss F, Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RA. TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int*, 4(4):795-804, Oct 1993.
- [172] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21938>
- [173] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=Gene&l=RAB6B>
- [174] Jacob N, Yang H, Pricop L, Liu Y, Gao X, Zheng SG, Wang J, Gao HX, Putterman C, Koss MN, Stohl W, Jacob CO. Accelerated pathological and clinical nephritis in systemic lupus erythematosus-prone New Zealand Mixed 2328 mice doubly deficient in TNF receptor 1 and TNF receptor 2 via a Th17-associated pathway. *J. Immunol.* 182: 2532-2541, 2009.
- [175] Tipping PG, Leong TW, Holdsworth SR: Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits. *Lab Invest* 1991, 65:272-279.
- [176] Barile M, Pisitkun T, Yu MJ, Chou CL, Verbalis MJ, Shen RF, Knepper MA. Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. *Mol. Cell Proteomics*. 2005; 100:31-42.
- [177] Rastaldi MP, Armelloni S, Berra S, Li M, Pesaresi M, Poczewski H, Langer B, Kerjaschki D, Henger A, Blattner SM, Kretzler M, Wanke R, D'Amico G. Glomerular podocytes possess the synaptic vesicle molecule Rab3A and its specific effector rabphilin-3a. *Am. J. Pathol.* 2003;163: 889-899.
- [178] Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwai T, Iwao H, Okamura M, Miura K. Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis. *J. Pharmacol. Sci.* 2008; 106: 56-67.

8 Abkürzungsverzeichnis

ANA	Anti-Nukleäre Antikörper
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	Blut-Harnstoff
C	Komplementfaktor
CRD	Cysteinreiche Domänen
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DC	Dendritische Zelle
DD	Death Domain
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNS
EDTA	Ethylendiaminetetraaceticacid
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas Associated Protein with Death Domain
FAM	Fluoreszenter Farbstoff
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulocyte/monocyte- colony stimulating factor
GN	Glomerulonephritis
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
HLA	Humane Leukocyten Antigen

i. p.	Intraperitoneal
Icam-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IK-GN	Immunkomplex-Glomerulonephritis
IKK	I- κ B kinase
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-induced protein-10
ISN/RPS	Society of Nephrology/Renal Pathology Society
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KG	Körpergewicht
LN	Lupusnephritis
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
MAPK	Mitogen-activated-protein kinase
Mcp-1	Monocyte chemoattractant protein-1
memTNF	Membrangebundenes TNF
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n.s	Nicht signifikant.
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PLAD	Preligation Association Domain
Rantes	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RIP-1	Receptor interacting protein-1
RMA	Robust multi-array analysis
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Real-time reverse transcription-polymerase chain reactio
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SMA	Smooth muscle actin
SODD	Silencer of death domain
SSC	Saline-sodium citrate Puffer
sTNF	Lösliches TNF
TACE	TNF-Alpha-Cleavage-Enzyme
TGF	Tumor growth factor
TH	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor necrosis factor
Tnfr1	Tumornekrose Faktor-Rezeptor I
Tnfr2	Tumornekrose Faktor-Rezeptor II
TNFRSF	TNF-Rezeptor-Superfamilie
TRADD	TNF Receptor 1-Associated Protein
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Vcam-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VIC	Fluoreszenter Farbstoff
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anela Taubitz
Geburtsdatum/-ort	20.05.1973, Gradacac
Staatsangehörigkeit	Bosnisch, seit 1992 in Deutschland lebend

Schulische Ausbildung

1988 – 1992	Wirtschaftsschule, 4. Berufsbildungsstufe Fachrichtung Landwirtschaft, Ernährung und Veterinärwesen Schulzentrum in Bosanski Samac, Bosnien- Herzegowina
1998 – 1999	Fachgebundene Hochschulreife Studienkolleg bei den Universitäten des Freistaates Bayern, München

Hochschulausbildung

10/1999 – 09/2005	Studium der Biologie mit dem Abschluss Diplom Biologin Ludwig Maximilian Universität München Schwerpunkte: Humangenetik, Medizinische Mikrobiologie, Zellbiologie und Psychologie Abschlussnote „Sehr gut“
11/2004 – 08/2005	Diplomarbeit Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der LMU München Thema: „Untersuchungen zur Germination des humanpathogenen Schimmelpilzes <i>Aspergillus fumigatus</i> “

Promotion

02/2006 – 2010	Promotion zum Doktor der Humanbiologie Klinikum der Universität München, Nephrologisch / Immunologische Forschung Thema: „TNF-Rezeptor 1- und 2-spezifische Entzündungsreaktionen im Glomerulus“
----------------	--

Zusatzqualifikation

02/2010

ATV Ausbildung Training Vernetzung GmbH München
„Life Science Management“ Zusatzqualifikation für
Pharmaindustrie und Biotechnologie (Vollzeit)

Themenkreise:

- Pharma-Management
- Wirtschaftliche Grundlagen
- Persönlichkeitstraining

Abschlussnote „Sehr gut“

Berufliche Tätigkeit

01/2011-gegenwärtig

als Clinical Research Associate (CRA)

Originalarbeiten

1. Taubitz A, Bauer B, Heesemann J, Ebel F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. Curr Microbiol., 54: 354-360, 2007.
2. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Anders HJ. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. J Am Soc Nephrol., 20: 1986-1996, 2009.
3. Schwarz M, Taubitz A, Allam R, Eltrich N, Vielhauer V. Analysis of glomerular and interstitial dendritic cells and their TNF-mediated recruitment in mouse kidneys by compartment-specific flow cytometry. Manuskript eingereicht.
4. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation. Manuskript fertiggestellt.
5. Taubitz A, Andersen K, Eltrich N, Vielhauer V. Anti-inflammatory function of TNF receptor 2 in systemic lupus erythematosus prone MRL/lpr mice. Manuskript in Vorbereitung.

Abstracts

1. Vielhauer V, Taubitz A, Bertler S, Eltrich N, Radomska E, Schlöndorff D. Expression of TNF receptors in intrinsic glomerular cells. Nieren Hochdruckkr., 35: 430, 2006.
(37. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Essen 23.09.-26.09.2006, Poster Mo-P7-08)
2. Vielhauer V, Taubitz A, Eltrich N, Bertler S, Radomska E, Schlöndorff D. Differential expression of TNF-receptors in intrinsic glomerular cells. J. Am. Soc. Nephrol., 17: 744A, 2006.
(39th Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Diego 14.11.-19.11.2006, Poster SA-PO803)
3. Taubitz A, Eltrich N, Bertler S, Radomska E, Vielhauer V. Expression of TNF-receptor 1 and 2 in glomerular endothelial and mesangial cells. Nephrol. Dial. Transplant., 22 (Suppl 6): vi104, 2007.
(XLIV Congress, European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association, Barcelona 21.06.-24.06.2007, Poster FP259)
4. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Preferential glomerular, not tubular expression of TNF receptor 1 and 2 in mouse kidney. Nieren Hochdruckkr., 36: 390, 2007.
(38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, München 22.09.-25.09.2007, Poster So-2-P23)
5. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. TNF-receptor 1 and 2 are preferentially expressed in the glomerular, but not tubulointerstitial compartment of mouse kidney. J. Am. Soc. Nephrol., 18: 194A, 2007.
(40th Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Francisco 31.10.-05.11.2007, Poster F-PO421)

6. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. TNF receptor 1- and 2-specific inflammatory responses in the glomerulus. Nieren Hochdruckkr., 37: 485, 2008.
(39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, Tübingen 27.09.-30.09.2008, Poster P 132)
7. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. TNF receptor-specific inflammatory responses in the glomerulus. J. Am. Soc. Nephrol., 19: 420A, 2008.
(41st Annual Meeting, American Society of Nephrology, Philadelphia 04.11.-09.11.2008, Poster F-PO1395)
8. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Die TNF-Rezeptoren 1 und 2 vermitteln unterschiedliche glomeruläre Entzündungsreaktionen. Abstract CD-ROM.
(115. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 18.04.-22.04.2009, Poster PS 114)
9. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Distinct roles of TNF receptor 1 and 2 in glomerular inflammation. Nephrol. Dial. Transplant. Plus, 2 (Suppl. 2), 2009.
(ISN World Congress of Nephrology, Mailand 22.05.-26.05.2009, Poster M393)
10. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P, Vielhauer V. Glomerular TNF receptor 1 and 2 mediate distinct inflammatory responses following TNF stimulation. Nieren Hochdruckkr., 38: 482-483, 2009.
(1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen 26.09.-29.09.2009, Poster P 217)
11. Schwarz M, Taubitz A, Vielhauer V. Characterization of glomerular dendritic cells by flow cytometry. Nieren Hochdruckkr., 38: 483-484, 2009.
(1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Göttingen 26.09.-29.09.2009, Poster P 221)

12. Vielhauer V, Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lemnitzer P. Glomerular TNF receptor 1 and 2 mediate distinct inflammatory responses upon TNF exposure. J. Am. Soc. Nephrol., 20: 303A, 2009.
(42nd Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Diego 27.10.-01.11.2009, Poster TH-PO835)
13. Vielhauer V, Schwarz M, Taubitz A. Characterization of glomerular dendritic cells by flow cytometry. J. Am. Soc. Nephrol., 20: 558A, 2009.
(42nd Annual Meeting, American Society of Nephrology, San Diego 27.10.-01.11.2009, Poster F-PO1957)
14. Schwarz M, Taubitz A, Vielhauer V. Durchflusszytometrische Charakterisierung glomerulärer dendritischer Zellen in der Maus. Med. Klin., 105 (Suppl. 1): 81, 2010.
(116. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 10.04.-14.04.2010, Poster PS 243, Posterpreis Nephrologie 2010)
15. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Vielhauer V. Characterization of the TNF-induced glomerular inflammasome. Nephrol. Dial. Transplant. Plus, 3 (Suppl. 3): iii130, 2010.
(XLVII Congress, European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association / 2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, München 25.06.-28.06.2010, Poster Sa292).

Vorträge

1. Taubitz A. Mechanismen der TNF-Rezeptor-vermittelten glomerulären Entzündungsreaktion. Junge Niere 2007, Göttingen 12.05.2007
2. Taubitz A. TNF-Rezeptor-spezifische Entzündungsreaktionen im Glomerulus. Junge Niere 2008, Berlin 17.05.2008

3. Taubitz A. Die TNF Rezeptoren 1 und 2 vermitteln unterschiedliche glomeruläre Entzündungsreaktionen. Junge Niere 2009, München 20.06.2009

10 Danksagung

Herrn PD Dr. Volker Vielhauer danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation unter seiner Betreuung in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und die Vergabe des interessanten Themas. Danke für die ständige Gesprächsbereitschaft und die lehrreiche Zeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders danke ich für die freundliche Unterstützung und die Möglichkeit der großzügigen Nutzung seines Labors.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei meiner Arbeitsgruppe. Speziellen Dank gilt dem lieben Nuru Eltrich für seine Hilfsbereitschaft und Patricia Lemnitzer.

Herrn Dr. Andreas Blutke, Institut für Tierpathologie der LMU München danke ich für die Hilfe beim Erlernen der paramagnetischen Glomeruli-Isolationsmethode.

Herrn Dr. Rainer Hoffmann, TU München, danke ich für die Durchführung der *Microarray*-Versuche.

Frau Dr. Maya T. Lindenmeyer und PD. Dr. Clemens Cohen, UniversitätsSpital Zürich danke ich für die Unterstützung bei der *Microarray*-Analyse.

Meinem Jonny ein großes Dankeschön für die tatkräftige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner akademischen Ausbildung. Danke für die jahrelange Begleitung in allen Lebenslagen, durch dick und dünn.

Der lieben Sylke danke ich ganz herzlich für ihre Freundschaft und das Korrekturlesen.

Meinen Mitdoktoranden Robert, Olga, Suffy, Ramanjanneyulu (Angi), Onkar und allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Klinische Biochemie danke ich für die Hilfsbereitschaft und die tolle Zeit mit euch.

Dr. Hicham Boube danke ich sehr herzlich für die wertvollen Diskussionen und seine unendliche Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch meinen lieben Freunden Doris Dephoff, Seher und Vedat, Cica, Tamara, Silke, Adria, Sanja, Waltraud und Erich, Farah, Dragan und Danijela.

Meiner Familie, die stets an mich geglaubt hat und mir in schwierigen Phasen zur Seite gestanden ist und mir Mut gemacht hat. Besonderer Dank gilt Pavo, Skolastika, Toni, Andrej, Maki, Tante Dragica und Onkel Bozo.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern danken für die bedingungslose Liebe aus der ich immer neue Kraft schöpfe und all die wertvollen Dinge, die Sie mir auf den Weg mitgegeben haben.